

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1932-1933. — No 231

RECHERCHES BIOCHIMIQUES

SUR

L'EXCRÉTION de la SANGSUE

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique et médicale)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Mention " PHARMACIE "

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 28 Juillet 1933

PAR

M^{me} BRACONNIER, née FAYEMENDY (Marie-Marguerite-Léa-Germaine)

PHARMACIEN

Née à EYMOUTHIER (Charente), le 22 Novembre 1907

Examineurs de la Thèse	{	MM. DELAUNAY, professeur. .	Président
		CHELLE, professeur . . .	Juges.
		GOLSE, professeur . . .	
		VITTE, agrégé.	

NIORT

IMPRIMERIE DU PROGRÈS, 27, RUE BASSE

1933

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1932-1933. — N° 231

RECHERCHES BIOCHIMIQUES

SUR

L'EXCRÉTION de la SANGSUE

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique et médicale)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Mention " PHARMACIE "

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 28 Juillet 1933

PAR

M^{me} BRACONNIER, née FAYEMENDY (Marie-Marguerite-Léa-Germaine)

PHARMACIEN

Née à EYMOUTHIER (Charente), le 22 Novembre 1907

Examineurs de la Thèse	{	MM. DELAUNAY, professeur. . .	Président
		CHELLE, professeur . . .	Juges.
		GOLSE, professeur . . .	
		VITTE, agrégé.	

NIORT

IMPRIMERIE DU PROGRÈS, 27, RUE BASSE

1933

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

M. SIGALAS..... Doyen

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. POUSSON, MOURE, W. DUBREUILH, RIVIÈRE, BARTHE
SELLIER, DENIGÈS, AUCHE

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie.....	MANDOUL.
id.	CASSAET.	Médecine expérimentale.	DUPÉRIÉ.
Clinique chirurgicale.....	CHAVANNAZ.	Clinique ophtalmologique	TEULIÈRES
id.	BÉGOUIN.	Clinique chirurg. infantile et orthopédie..	ROCHER.
Pathologie et thérapeutiques générales..	CARLES.	Clinique gynécologique	GUYOT.
Clinique d'accouchements	ANDÉRODIAS.	Clinique méd. des maladies des enfants..	CRUCHET.
Anatomie path. et microscopie clinique.	SABRAZÈS.	Chimie biologique et médicale.....	DELAUNAY
Anatomie.	VILLEMEN.	Physique médicale et pharmaceutique....	SIGALAS.
Anatomie générale et histologie.....	G. DUBREUIL.	Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques.	BONNIN.
Physiologie.....	PACHON.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques.	PETGES.
Hygiène.....	LECRET.	Clinique des maladies des voies urinaires.	DUVERGEY.
Médecine légale et déontologie.....	LANDE.	Clinique des malad. nerveuses et mentales.	ABADIE.
Electroradiologie et clin. d'électric. médic.	RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie.....	PORTMANN
Chimie.....	CHELLE.	Toxicologie et Hygiène appliquée.....	LABAT.
Botanique et matière médicale	BEILLE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie.	CREYX.
Pharmacie.....	DUPOUY.	Clinique dentaire.....	CAVALIÉ.

MM. MICHELEAU (Médecine générale), MURATET (Anatomie pathologique), GOLSE (Pharmacie)
LACOSTE (Histologie), PÉRY (Obstétrique), PERRENS (Maladies mentales)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	DUBECQ.	Chirurgie générale.....	PAPIN.
id.	DUFOUR.	id.	JEANNENE
Physiologie.....	FABRE.	id.	CHARRIER
Parasitologie et sciences naturelles	R. SIGALAS.	id.	LOUBAT.
Médecine générale.....		Obstétrique.....	RIVIÈRE.
id.	AUBERTIN.	Ophtalmologie	BEAUVIEUX
id.	DAMADE.	Dermatologie et syphiligraphie.....	JOULIA.
id.	PIÉCHAUD.	Chimie générale pharmaceut. et toxicologie.	VITTE.
id.	DELMAS-MARSALET.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	PAPIN.	Puériculture	FAUGÈRE.
Accouchement:.....	PÉRY.	Démonstrations et préparations pharmac..	GOLSE.
Ophtalmologie.....	CABANNES (en congé).	Zoologie et parasitologie	R. SIGALA

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. MM. N.

Cours complémentaire annexe. — Prothèse et rééducation professionnelle..... GOURDON

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE,
DE MON GRAND-PÈRE ET DE MON FRÈRE

A TOUS LES MIENS ET A TOUS MES AMIS

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR H. DELAUNAY

*Professeur de Chimie biologique et médicale à la Faculté de Médecine,
Docteur ès Sciences naturelles,
Membre correspondant de la Société de Biologie,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.*

Témoignage de profonde gratitude

RECHERCHES BIOCHIMIQUES

SUR

L'EXCRÉTION DE LA SANGSUE

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique et médicale)

INTRODUCTION

La Biochimie de l'excrétion des Invertébrés a été peu étudiée et est encore mal connue. Si de récentes études, portant sur l'ensemble des Invertébrés, ont éclairé certaines particularités du métabolisme, il en est peu qui consacrent à un seul Invertébré des recherches systématiques basées sur l'emploi des méthodes chimiques de microanalyse que nous possédons actuellement. Ces recherches se justifient cependant par l'intérêt biologique qu'elles présentent.

Sur les conseils de M. le professeur Delaunay, nous avons étudié l'excrétion de la Sangsue. Le choix de cet invertébré se justifie par les nombreux avantages qu'il présente au point de vue expérimental. Son emploi courant en médecine permet de se le procurer facilement, il vit bien dans l'eau distillée et fournit ainsi une excrétion dont les produits sont facilement repérables et dosables ; enfin, il s'alimente avec du sang de mammifères dont la teneur en protides, en glucides et en lipides est connue.

Vue d'ensemble sur l'excrétion. Données historiques

La Sangsue ordinaire (*Hirudo Officinalis*) élimine, comme tout organisme, de l'eau, des déchets minéraux, des déchets organiques carbonés et azotés. Les recherches effectuées sur chacune de ces parties peuvent être résumées ainsi qu'il suit :

I. L'EAU. — La Sangsue élimine de l'eau, dans le jeûne et aussitôt après son alimentation, en quantités très différentes. A. Pütter [31] a fourni des renseignements à ce sujet. Une Sangsue, dont le poids était de 0 gr. 8 (0 gr. 128 de poids sec) et qui avait jeûné pendant un an, a été alimentée avec du sang de mammifère. Son poids s'est élevé à 4 grammes (0 gr. 768 poids sec). Au cours des deux cents premiers jours après l'alimentation, le sang absorbé (3 gr. 2) a été élaboré et l'animal a éliminé de l'eau. Pendant les cent premiers jours, il a été excrété en moyenne 5,8 fois plus d'eau que de substance sèche (2 mgr. 68 de substance sèche pour 15 mgr. 32 d'eau). Pour les cent jours suivants, l'excrétion a été d'environ 2,8 fois plus d'eau que de substance sèche. Après deux cents jours, l'élaboration de l'aliment était terminée et le poids sec de l'animal, diminué de la quantité de substance sèche excrétée au cours de ce temps, a augmenté d'environ 89 %. Dans les cent jours qui suivent, l'animal a utilisé ces matériaux et excrété 1 mgr. 2 de substance sèche par jour, puis est revenu peu à peu à son état primitif. Pütter estime donc que la Sangsue élimine en moyenne 15 mgr. 32 d'eau par jour aussitôt après l'alimentation et 3 mgr. 5 seulement trois cents jours après.

II. LES DÉCHETS MINÉRAUX. — On doit trouver dans l'excrétion de la Sangsue les constituants minéraux du sang qui a servi à l'alimentation : phosphates, sulfates, chlorures, carbonates, sodium, potassium, calcium et fer.

Il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux se rapportant

à la détermination de ces éléments. A peine peut-on prendre pour un essai de recherche du fer une partie du travail de Spiess [36] dont le résumé est donné au chapitre suivant.

III. LES DÉCHETS AZOTÉS. — Nous signalerons tout d'abord que Jolyet et Regnard [21], dans leurs recherches classiques sur la respiration des animaux aquatiques, ont constaté une augmentation de l'azote (27 cm^3) dans le liquide où avaient vécu pendant quarante-neuf heures cent quatre Sangsues venant d'être alimentées avec du sang, mais comme ces auteurs n'ont pas trouvé d'augmentation d'azote pour les animaux à jeun, ils pensent que l'augmentation d'azote peut s'expliquer, au moins en partie, par la libération de l'azote dissous dans le sang absorbé.

L'excrétion azotée organique soluble a été très étudiée et est actuellement bien connue à la suite des travaux de A. Pütter [31], Bialaszewicz [14], St. J. Przylecki [32] et H. Delaunay [6]. L'azote indéterminé excrété ne dépasse pas, en effet, 9 % pour les animaux à jeun et 11 à 15 % pour les animaux en digestion.

Répartition de l'azote organique. — Ammoniaque. — Comme pour tous les invertébrés aquatiques, les déchets azotés sont éliminés surtout sous forme d'*ammoniaque* ou plus exactement de bases azotées volatiles. L'azote volatil titrable au formol représente 70 à 80 % de l'azote total excrété, d'après H. Delaunay [6].

Azote aminé. — Cette excrétion, d'après H. Delaunay, est inférieure à 5 %.

Urée. — L'excrétion d'*urée* n'est pas nulle, comme l'a admis Pütter [31], mais elle est très faible ; l'azote dû à l'urée représente seulement 4 % de l'azote total chez les animaux à jeun, il peut s'élever à 10 % chez les animaux en digestion par suite de l'élimination de l'urée absorbée avec le sang.

Acide urique. — H. Delaunay [6] n'a jamais trouvé d'*acide urique* dans l'eau contenant les excréta. Les traces qu'on peut

y rencontrer après alimentation sont sans doute dues à l'acide urique ingéré avec le sang qui a servi à alimenter les animaux.

Purines. — Pütter [31], analysant l'eau dans laquelle avaient vécu trois cents Sangsues pendant cent heures, a trouvé dans le liquide, débarrassé du mucus, 1 mgr. 4 d'*N purique* pour 80 mgr. d'azote total. D'après H. Delaunay [6], l'excrétion purique varie de 2 à 5 % de l'azote total excrété.

Créatine et créatinine. — La recherche de la quantité d'azote excrété sous forme de *créatine* et de *créatinine* est intéressante, mais, à notre connaissance, elle n'a pas encore été faite. On trouvera dans ce travail (Chapitre II) le résultat de nos recherches.

IV. LES DÉCHETS CARBONÉS. — Si l'excrétion azotée de la Sangsue est bien connue, il n'en est pas de même de son excrétion carbonée. Les travaux sur ce sujet sont très rares.

L'excrétion carbonée de la Sangsue s'effectue sous trois formes principales : sous forme d'acide carbonique, produit final des combustions organiques ; sous forme de matériaux carbonés solubles et encore combustibles présents dans le liquide où ont vécu les animaux, dont l'ensemble constitue ce que nous appelons le « carbone organique » ; sous forme de carbone appartenant au mucus sécrété par l'animal.

Acide carbonique. — De nombreuses recherches ont été faites sur les échanges respiratoires de la Sangsue. Les principaux travaux donnant les quantités de gaz carbonique exhalées par la Sangsue sont ceux de Jolyet et Regnard [21] et de A. Pütter [31].

Jolyet et Regnard, en des expériences dont nous donnerons plus loin le détail, ont calculé que le volume de CO^2 exhalé par heure et par kilogramme de Sangsues est de 16 cm^3 , tandis que, pour 1 kilogramme de Sangsues alimentées, il atteint 39 cm^3 7.

A. Pütter a également fait des expériences similaires : 50 à

75 gr. de Sangsues, nourries trois mois auparavant, ont exhalé 86 à 136 mgr de CO_2 en deux jours pour une température de 17 à 19°. Pour une température inférieure, l'excrétion de CO_2 s'est montrée plus faible.

Mucus. — Par desquamation normale de la peau, les Sangsues éliminent des cocons hyalins, muqueux. On considère cette desquamation comme une sorte d'excrétion cutanée. Ce mucus a été considéré pendant longtemps comme la forme la plus importante de l'excrétion carbonée organique.

Cette excrétion varie, d'après A. Pütter, de 9 à 30 mgr. exprimés en CO_2 , selon la température, pour un kilogramme de substance sèche, pendant une heure.

Carbone organique soluble. — Une autre partie du carbone est éliminée, d'après Pütter [31], sous forme soluble n'appartenant ni à l'acide carbonique, ni au mucus.

Pütter [31] l'a déterminé indirectement par la différence entre la somme du carbone de CO_2 et du carbone du mucus d'une part et la perte de carbone subie par les animaux depuis le début de l'expérience d'autre part. Il a ainsi calculé une grandeur élevée, puisqu'elle atteint jusqu'à la moitié du carbone total excrété.

En dehors de A. Pütter, il n'existe pas, à notre connaissance, d'autres auteurs qui aient étudié l'excrétion des corps carbonés organiques solubles.

Cette question est cependant très importante. Elle peut être actuellement abordée, grâce aux microméthodes, comme l'a été celle de l'excrétion azotée et c'est dans cette direction que nous avons porté nos efforts.

A vrai dire, si les documents manquent pour la Sangsue, il n'en est pas de même pour les Oligochètes. On sait, en effet, grâce aux recherches de A. Flury [12], de Weinland [45], de A. Fischer [11], que ces vers parasites excrètent en quantité des acides organiques.

A. Flury a dosé l'acidité volatile des excréta d'*Ascaris* et a identifié dans ces derniers : l'acide formique, l'acide butyrique

et l'acide valérianique. Weinland a également trouvé dans le liquide où ont vécu les *Ascaris* de l'acide valérianique. A. Fischer, opérant sur des *A. megalcephala*, a identifié l'acide lactique.

Nous nous sommes préoccupé de savoir dans quelle mesure la Sangsue se comporte comme les vers parasites au point de vue de l'excrétion d'acides ; nous avons cherché, en outre, à établir la répartition des acides organiques totaux en dosant séparément les acides volatils et les acides fixes. Une tentative d'identification des acides volatils a encore été faite.

*
* *

II

Recherches personnelles

Notre travail a eu pour but de donner une étude aussi complète que possible de l'excrétion chez la Sangsue dans diverses conditions.

A jeun, la Sangsue présente une période d'activité ralentie : ses oxydations sont réduites. Après alimentation avec du sang, les combustions augmentent et l'excrétion est notablement plus forte. Il était donc nécessaire d'étudier l'excrétion, comme l'ont d'ailleurs fait les auteurs qui nous ont précédé, pendant le jeûne et pendant la digestion.

En outre, les travaux de A. Pütter [31] sur des Sangsues soumises à une privation presque complète d'oxygène ont montré une altération profonde de leur métabolisme : CO_2 est excrété en quantité plus élevée, l'excrétion de NH_3 est diminuée. Nous avons repris ces travaux et, sur deux lots de Sangsues mis en anaérobiose, nous avons étudié l'excrétion comparativement aux mêmes animaux en vie normale.

Nos expériences ont porté sur divers lots de Sangsues ordinaires (*Hirudo Officinalis*) à jeun à leur arrivée au laboratoire et de grosseur moyenne.

Quatre lots ont été conservés à jeun pour être étudiés ainsi ;

quatre autres ont été nourris avec du sang frais de cheval, défibriné, jusqu'à refus. De ces quatre derniers lots, deux ont été soumis à l'anaérobiose.

Voici les poids de ces divers lots et le nombre des animaux compris dans chaque lot :

Sangsues à jeun :

Lot n° 1 : 25 Sangsues. Poids	41 gr. 91
Lot n° 2 : 25 Sangsues. Poids	43 gr. 72
Lot n° 3 : 15 Sangsues. Poids	23 gr. 45
Lot n° 4 : 15 Sangsues. Poids	21 gr. 09

Sangsues alimentées :

Lot n° 1 : 8 Sangsues. Poids	48 gr. 67
Lot n° 2 : 8 Sangsues. Poids	43 gr. 35
Lot n° 3 : 15 Sangsues. Poids	115 gr. 57
Lot n° 4 : 15 Sangsues. Poids	113 gr. 29

Les poids de ces quatre lots ont été déterminés aussitôt après l'alimentation, les animaux ayant été débarrassés par lavage du sang resté à leur surface.

Sangsues en anaérobiose :

Lot n° 1: 12 Sangsues pesant 24 gr. 52, alimentées depuis 67 jours.

Lot n° 2: 14 Sangsues pesant 55 gr. 99, alimentées depuis 46 jours.

Pour toutes les analyses, les résultats ont été rapportés à 100 gr. de Sangsues vivant dans 500 cc³ d'eau distillée pendant quarante-huit heures. Les calculs sont faciles pour les Sangsues à jeun et en anaérobiose (une simple règle de trois permet d'obtenir le résultat cherché), mais ils sont plus délicats pour les Sangsues alimentées. En effet, nous entendons, pour les 100 gr. pris comme point de comparaison, 100 gr. de

matière vivante et non 100 gr. de matière vivante + sang ingéré. Or, le poids des Sangsues aussitôt après l'alimentation est constitué évidemment, pour une forte partie, par le sang ingéré qui ne peut être considéré que comme aliment mis en réserve ; d'autre part, nous n'avons pas pu peser les animaux avant l'alimentation, car tous ne prenaient pas le sang de cheval et nous n'avons conservé pour les étudier que ceux qui étaient bien gorgés. Dans ces conditions, nous avons convenu de calculer nos résultats d'après les poids de nos différents lots de Sangsues un et deux mois après l'alimentation.

Voici les poids des quatre lots de Sangsues alimentées :

Lot n° 1 : Poids après deux mois . . .	18 gr. 76
Lot n° 2 : — — — — —	17 gr. 43
Lot n° 3 : Poids après un mois . . .	55 gr. 99
Lot n° 4 : — — — — —	63 gr. 70

Pour obtenir des résultats plus sûrs, nous avons généralement étudié simultanément deux lots de Sangsues renfermant (à l'exception des Sangsues en anaérobiose) le même nombre d'animaux.

Toujours pour éliminer autant que possible les causes d'erreur et aussi pour procéder à des calculs plus simples, nous avons fait vivre les animaux dans une quantité connue d'eau distillée : 500 cm³ ou 1.000 cm³, selon le nombre de recherches à effectuer. Dans tous les cas, les résultats expriment l'excrétion absolue pendant quarante-huit heures.

Pour les Sangsues à jeun et alimentées, les animaux ont été placés, après avoir été pesés, dans des flacons de 750 à 1.000 cm³ à large ouverture. Dans ces flacons portant un trait de jauge indiquant 500 cm³, on verse avec précaution, pour ne pas traumatiser les animaux, 500 cm³ d'eau distillée que l'on renouvelle toutes les quarante-huit heures pour les lots 1 et 2 de Sangsues alimentées et à jeun et toutes les vingt-quatre heures pour les lots 3 et 4. Pour permettre une aération facile, les flacons sont fermés par une toile à larges mailles, maintenue au moyen d'un lien de caoutchouc.

Dans le cas des Sangsues soumises à l'anaérobiose, nous avons opéré de la façon suivante : les animaux ont été placés dans des flacons de 750 cm³ environ remplis d'eau distillée, surmontée d'une couche d'huile de vaseline, et fermés hermétiquement avec une plaque de verre sans interposition d'air et maintenue par un poids. Les deux lots que nous avons soumis à cette privation d'oxygène venaient, nous l'avons dit, d'être alimentés depuis quarante-six et soixante-sept jours, ce qui explique leur moindre résistance à l'anaérobiose. Il est arrivé souvent, en effet, que ces animaux, au bout de quelques heures, surtout lors du renouvellement d'eau distillée, ont rejeté abondamment du sang provenant de leur tube digestif qui, se répandant dans le liquide, le rendaient inutilisable. Ces liquides, très colorés après filtration, donnaient avec le réactif de Tanret un louche à froid, persistant à chaud, indiquant la présence de protéines et de peptones. Nous les avons rejetés. Nous avons étudié seulement les liquides parfaitement limpides et incolores ne renfermant pas d'albumine; ils ont été recueillis par siphonage.

Pour le lot n° 2, le liquide des 2^{es} vingt-quatre heures, seul, a été analysé ; pour le lot n° 1, le 2° et le 3° liquides, puis, toujours sur le même lot, remis en anaérobiose, le 4° et le 5° liquides de 500 cm³ chacun ont été réunis pour l'analyse.

Les liquides contenant les excréta, que nous appellerons pour plus de commodité « liquides d'excrétion », ont été conservés par addition de toluène en quantité suffisante pour les recouvrir, afin d'éviter les fermentations.

Au moment de l'analyse, chacun des liquides a été filtré sur papier mouillé (ce qui, dans le cas des Sangsues placées en anaérobiose, élimine l'huile de vaseline entraînée avec l'eau lors du transvasement, qui rendrait impossibles les dosages de carbone).

III

Technique chimique

Nos dosages peuvent se diviser en deux groupes :

- 1° Dosages effectués sur le liquide d'excrétion filtré ;
- 2° Dosages effectués sur le résidu d'évaporation de ce liquide.

Sur la liqueur primitive, nous avons pratiqué la *détermination* du pH par la méthode colorimétrique et le *microdosage de l'azote total* par Kjeldhalisation, suivant la méthode habituelle, en utilisant 50 cm³ de liquide.

Les autres dosages ont été faits *sur le résidu d'évaporation* des liquides d'excrétion, la quantité de produits à doser étant trop faible pour permettre un dosage direct.

Le liquide filtré a été réparti dans des capsules (porcelaine ou pyrex) de 50 cm³ et évaporé au bain d'eau à 60-70°. Pour éviter la perte de corps volatils, le liquide des capsules devant servir au dosage du carbone total, des acides organiques et du carbone de ces acides, a été préalablement alcalinisé par deux ou trois gouttes de solution aqueuse d'ammoniaque et, inversement, le liquide des capsules devant servir au dosage de l'azote ammoniacal a été acidifié par quelques gouttes de solution d'acide trichloracétique à 2 % destiné à fixer les produits ammoniacaux volatils. Il est inutile de dire que l'évaporation des liquides alcalinisés par l'ammoniaque et l'évaporation des liquides acidifiés n'ont pas été faites en même temps.

Sur le résidu d'évaporation repris par l'eau distillée, nous avons pratiqué les dosages suivants :

1° Excrétion minérale :

- a) Dosage des *phosphates* par la méthode céruléo-molybdimétrique de G. Denigès [9] ; dosage des *chlorures* par la méthode de Charpentier-Vohlard à l'azotate d'argent.

2° Excrétion azotée :

En plus de l'azote total indiqué plus haut, nous avons déterminé *l'azote de l'ammoniaque* et *l'azote des acides aminés* à l'aide de la microméthode au formol de H. Delaunay.

L'ammoniaque a été séparée des acides aminés par entraînement par un courant d'air et fixation dans une solution étendue d'acide chlorhydrique dilué (1/20) au moyen d'un appareil à barbotage construit suivant les indications de Folin [3]. Elle est ensuite titrée suivant la microméthode au formol de H. Delaunay. Les acides aminés ont été dosés suivant le même principe avec des différences de technique que nous indiquerons plus loin ; *l'azote de la créatinine*, dosée par la méthode de Folin, a été calculé.

Les résultats obtenus ont permis d'établir les rapports de l'azote ammoniacal, de l'azote aminé, de l'azote de la créatinine, de l'azote dosé et de l'azote indéterminé pour 100 d'azote total.

3° Excrétion carbonée :

Sur le résidu d'évaporation de 100 cm³ de liquide d'excrétion, nous avons dosé *le carbone total* par fusion alcaline suivant la microméthode de Nicloux-Lescœur [29].

Sur le résidu d'évaporation de 150 cm³ a été déterminé :

a) *Le carbone appartenant aux acides organiques totaux*, suivant la méthode de M. Lafargue [23].

b) *Les acides organiques totaux et les acides volatils*, suivant la technique du même auteur.

En outre, par la méthode de Duclaux [40], pour la *recherche et le dosage des acides volatils*, nous avons tenté d'identifier certains de ces acides. Cet essai, effectué une seule fois, ne nous a pas permis de fixer exactement la nature de ces acides, mais nous a donné quelques indications.

Nous avons dosé le carbone des substances réductrices, proba-

blement d'origine glucidique, déterminées par la méthode de Hagedorn-Jensen [20] après hydrolyse acide et exprimées en glucose.

Enfin, le carbone de la créatinine a été calculé après dosage de ce corps par la méthode de Folin [13].

Les chiffres obtenus ont permis d'établir les rapports pour cent :

- des acides volatils aux acides organiques totaux,
- du carbone des acides organiques au carbone total,
- du carbone glucidique au carbone total,
- du carbone de la créatinine au carbone total.

Le carbone indéterminé a été calculé par différence.

Signalons aussi que nous avons fait quelques recherches sur l'acide carbonique excrété en vue d'établir un rapport entre l'excrétion de carbone sous forme de CO_2 et de carbone sous forme de constituants organiques.

4° Rapport carbone sur azote :

Les dosages d'azote total et de carbone total nous ont permis de déterminer, dans diverses conditions de la vie des Sangsues, le rapport carbone sur azote. Nous verrons que ce rapport, dont l'importance est bien connue, subit des variations importantes pendant l'anaérobiose et que son interprétation donne lieu à des hypothèses intéressantes sur le métabolisme général.

*
**

Nos recherches, bien que limitées et incomplètes, nous ont cependant permis d'avoir une vue d'ensemble de l'excrétion de la Sangsue.

La division de notre travail est la suivante :

Le chapitre premier est consacré à l'étude de l'excrétion minérale. Il comprend un exposé historique de la question, les techniques des divers dosages, les résultats obtenus et les conclusions qu'on en peut tirer.

Le chapitre deuxième est réservé à l'excrétion azotée et est traité suivant le plan du précédent chapitre.

Le chapitre troisième comprend ;

1° L'étude du carbone organique : exposé historique de la question ; technique des divers dosages ; résultats obtenus et conclusions qui s'en déduisent ;

2° Un essai d'identification des acides organiques volatils ;

3° L'étude de l'excrétion d'acide carbonique ;

4° L'étude du rapport $\frac{C}{N}$

Enfin, nous basant sur les faits déjà acquis et sur nos résultats personnels, nous essayons dans la conclusion, par un examen critique de ces données, d'en dégager la signification au point de vue biologique.

CHAPITRE PREMIER

EXCRÉTION MINÉRALE

I. — Historique

Il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux relatifs à l'excrétion minérale de la Sangsue en dehors du travail de Pütter [31] qui a étudié l'excrétion d'eau (voir introduction) et du mémoire de Spiess, où l'on trouvera le résultat de recherches sur la présence de pigments biliaires et de fer dans l'eau contenant les excréta. Cet auteur a opéré sur l'extrait aqueux obtenu après évaporation au bain-marie de 50 litres d'eau où avaient vécu pendant plusieurs semaines 1.400 à 1.500 Sangsues. Après filtration, il a obtenu 9 gr. d'un résidu olivâtre qu'il a épuisé complètement par l'alcool à 90° bouillant. Le résidu, insoluble dans l'alcool, a été repris successivement par le chloroforme et par une solution étendue de lessive de soude. Les réactions de l'urobiline et des pigments biliaires, pratiquées sur ces trois extraits, ont été positives.

L'auteur a décelé aussi la présence du fer, ce qui paraît naturel, puisque les Sangsues avaient été alimentées avec du sang. Par contre, la réduction de l'azotate d'argent, après addition de carbonate de soude par l'extrait aqueux, considérée par l'auteur comme une réaction caractéristique de l'acide

urique, nous semble plutôt due aux chlorures du sang que l'on retrouve en quantité relativement élevée dans le liquide où ont vécu les Sangsues.

*
**

II. — Recherches personnelles

Nous avons réuni, dans ce chapitre, les chiffres trouvés pour le pH, les chlorures et les phosphates des liquides d'excrétion de Sangsues à jeun, alimentées et en anaérobiose.

Comme nous l'avons dit plus haut, les résultats obtenus ont été rapportés à 100 gr. d'animal vivant dans 500 cm³ d'eau distillée pendant 48 heures, afin de permettre des comparaisons plus rapides entre les lots divers de Sangsues et de mieux rendre compte des différences dans l'excrétion dues aux changements des conditions expérimentales.

Nous renvoyons, pour le nombre de Sangsues et le poids des divers lots, à l'Introduction.

A. Le pH.

Le pH des liquides contenant les excréta de la Sangsue n'a pas encore été déterminé à notre connaissance. Nous l'avons étudié systématiquement au début de chaque analyse d'un liquide d'excrétion. Il fournit des résultats intéressants en ce sens qu'il donne une indication sur l'état de l'équilibre acide-base de l'animal.

Technique. — Le pH a été déterminé sur les liquides filtrés aussitôt après leur récolte, afin d'éviter les altérations susceptibles de l'influencer. Les mesures ont été faites colorimétriquement en utilisant trois indicateurs colorés : bromothymol bleu, bromocrésol pourpre et phénol sulfone phtaléine, ainsi que les échelles colorimétriques de Kulmann. L'indicateur à employer a été déterminé par un essai approximatif. Après l'avoir choisi, on en ajoute 0 cm³ 25 à 5 cm³ de liquide filtré et limpide. On mélange doucement et l'on compare avec des tubes témoins des échelles colorimétriques au bloc de Walpole, suivant la technique connue.

Les résultats obtenus sur le liquide d'excrétion des différents lots sont les suivants :

pH	Sangsues à jeun				Sangsues alimentées				Sangsues en anaérobiose	
—	—				—				—	
Lots n°...	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II
Maximum.	7,5	7,5	7,5	7,5	7,6 +	7,6	7,6	7,6	5,9	6,6
Minimum.	7,3	7,2	7,1	7,2	7,3	7,4	7,0	7,0	5,5	5,5
Moyenne .	7,35	7,3	7,25	7,3	7,4	7,5	7,35	7,3		

De l'examen de ce tableau, il se dégage quelques faits intéressants :

1° Le pH des liquides où ont vécu des Sangsues à jeun se place aux environs de 7,3, avec des oscillations faibles. La réaction est donc faiblement alcaline ; elle s'explique, nous le verrons plus loin, par l'élimination d'une quantité relativement élevée d'ammoniaque qui, d'une part, neutralise les acides organiques excrétés et l'acide carbonique dissous dans l'eau et, d'autre part, suffit à elle seule à abaisser légèrement la réaction ionique du milieu. Ce pH paraît favorable à la vie normale de la Sangsue ; il est d'ailleurs voisin de celui du sang des vertébrés et des milieux vitaux les plus répandus.

2° Le pH des liquides d'excrétion de Sangsues alimentées varie de 7,6 + à 7,1 et 7 pour se stabiliser tardivement, quand la digestion est avancée, aux environs de 7,3. La réaction ionique est la plus basse aussitôt après l'alimentation, ce qui semble indiquer une combustion moins parfaite des acides organiques.

3° La privation d'oxygène a pour conséquence d'augmenter nettement l'acidité ionique des liquides. Le pH s'abaisse, en effet, à 5,5 après quarante-huit heures d'anaérobiose, au lieu de 7,3 à l'état normal. On peut expliquer ce fait par l'accumulation d'acide carbonique dissous dans le liquide et aussi par l'augmentation de l'excrétion des acides organiques vola-

tils, dont la combustion est rendue difficile par le manque d'oxygène et par la baisse de l'excrétion ammoniacale, facteurs que nous étudierons plus loin.

B. LES CHLORURES.

Nous avons opéré le dosage sur le résidu de l'évaporation au bain-marie à 60-70° de 50 cm³ de liquide d'excrétion, car le dosage direct sur 50 cm³ de liquide primitif manque de netteté.

Nous avons utilisé la méthode de Charpentier-Volhard, adaptée à la microchimie, ainsi que la méthode de Mohr. Nous ne donnons pas ici les principes bien connus de ces deux méthodes, mais seulement la technique de la première que nous avons plus couramment employée. Le résidu d'évaporation de 50 cm³ de liquide d'excrétion est repris, dans la capsule qui le contient, par quelques gouttes d'acide azotique concentré. On ajoute 10 cm³ d'une solution $\frac{N}{50}$ d'azotate d'argent, 2 cm³ de solution saturée d'alun de fer ammoniacal et on titre l'azotate d'argent en excès au moyen d'une solution $\frac{N}{50}$ de sulfocyanate de potassium. Soient n cm³ de solution employés. La quantité de chlorures, exprimés en ClNa, sera pour 50 cm³ de liquide d'excrétion :

$$(10 - n) \times \frac{5,85}{5} = \text{ClNa en mgr. pour } 50 \text{ cm}^3.$$

(Il est bien entendu que ce chiffre de 10 ne peut être utilisé que dans le cas où les liqueurs titrées se correspondent exactement, ce qui n'est pas absolument nécessaire. Dans tous les autres cas, on utilisera les constantes de correspondance données par un essai préliminaire.)

Les résultats des analyses sont exprimés par le tableau suivant, où l'on trouvera seulement les chiffres les plus caractéristiques de l'excrétion dans diverses conditions :

	Périodes de 48 heures	SANGSUES A JEUN				SANGSUES ALIMENTÉES				SANGSUES en anaérobiose	
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II
Cl Na en mgr. pour 100 gr. de sangues	1 ^{re}	4,04	2,58	7,2	5,15	497,08	539,02	488,2	255,4	27,7 ⁽¹⁾	13,6
	2 ^e	1,34	7,74	14,4	12,8	56,2	51,9	26,2	12,4	23,8 ⁽¹⁾	
	3 ^e	2,69	6,45	9,64	7,72	15,06	12,9	14,1	7,2	17,8 ⁽¹⁾	
	4 ^e	5,39	3,87	4,82	5,15	6,02	13,3	9,4	5,3	7,9 ⁽²⁾	

L'examen de ce tableau montre que :

1° La Sangsue excrète normalement des chlorures en vie aérobie (à jeun et alimentée) et en anaérobiose ;

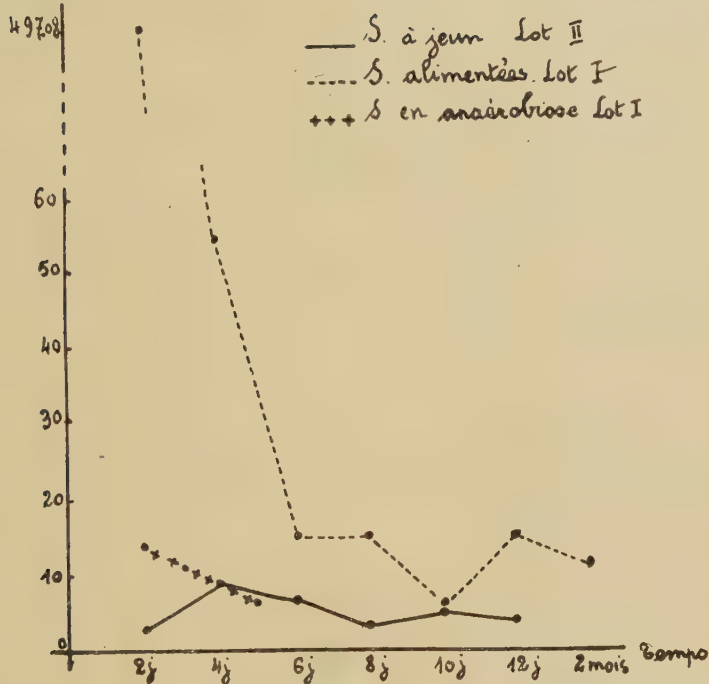
2° Les quantités de chlorures éliminées à jeun sont faibles et se répartissent entre des limites relativement éloignées : (minimum 1 mgr. 34, maximum 14 mgr. 4) la quantité moyenne étant d'environ 6 mgr. 31 par quarante-huit heures et pour 100 gr. ;

3° Dans les quarante-huit heures qui suivent leur alimentation, les Sangsues excrètent des quantités énormes de chlorures (près de 540 mgr.). Ces quantités deviennent beaucoup plus faibles les jours suivants pour se stabiliser, vers le huitième jour, à des valeurs voisines du jeûne. Nous avons traduit ces résultats sous forme de courbes pour bien mettre en évidence l'excrétion énorme de chlorures quarante-huit heures après l'alimentation.

1. — Période de 24 heures.

2. — Retour à l'aérobiose.

Cl Na en Mgr
p. 100 gr de
Sangues



Cette courbe d'élimination semble prouver que, chez un animal à digestion lente et dont l'intestin fonctionne comme un organe de réserve, il y a après l'alimentation une concentration du sang ingéré par suite de l'élimination rapide d'une sorte de solution salée plus ou moins isotonique.

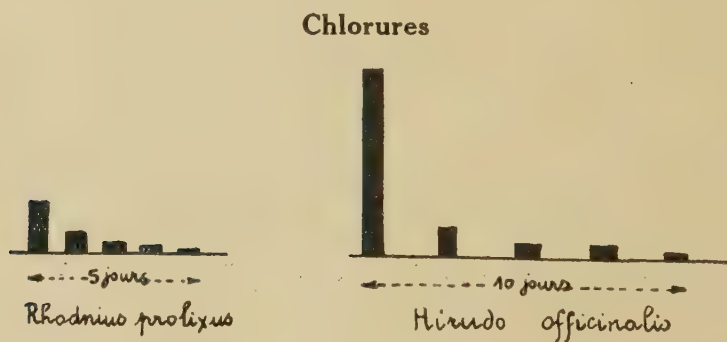
Pütter [31], qui, toutefois, n'a pas étudié l'élimination des chlorures, avait déjà observé une forte élimination d'eau consécutive à l'ingestion du sang. (Voir introduction.) Le fait paraît d'ailleurs très général, car on le retrouve chez les insectes suceurs de sang.

II. Wigglesworth [42] a étudié l'excrétion d'un insecte suqueur de sang, le *Rhodnius Prolixus* ; il a constaté lui aussi

une élimination rapide de l'eau et des chlorures. Voici, du reste ce qu'a écrit l'auteur :

« Les chlorures sont présents en grande quantité pendant les premières vingt-quatre heures ou quarante-huit heures (dans les excré-
tions), mais après seulement à l'état de traces. L'élimination d'une
grande quantité de liquide clair aussitôt après l'alimentation est
caractéristique de presque tous les insectes suceurs de sang. Le pré-
sent travail a montré que pour le *Rhodnius* (et c'est probablement
vrai pour les autres insectes suceurs de sang) c'est une solution
salée, plus ou moins isotonique avec le sang ingéré, qui sert à
l'élimination rapide des sels non voulus par la diète, « unwanted salts
in the diet ». Près de 75 % de l'eau des aliments est éliminée de
cette façon et on peut montrer, par le calcul, que ce volume de
solution salée isotonique contient à peu près tous les sels du sang... »

L'alimentation du *Rhodnius Prolixus* étant semblable à celle
de l'*Hirudo*, leurs excréments sont comparables, elles présentent
une similitude assez grande que font apparaître les deux dia-
grammes ci-dessous :



Le travail de H. Wigglesworth [42] nous a conduit à nous
poser la question suivante :

A combien pouvons-nous estimer la quantité de chlorures
éliminés pendant les six premiers jours de la digestion ?

Nous avons calculé, d'après la quantité de chlorures excrétés
pendant les six premiers jours et qui représente, selon nous,

seulement « les sels non voulus par la diète », la quantité de sang de cheval ingéré, en sachant que 1 litre de sang de cheval contient en moyenne 6 gr. de ClNa .

Comme nous n'avons pas pu peser nos divers lots de Sangsues avant et après l'alimentation, de façon à obtenir la quantité réelle de sang ingéré, nous l'avons calculée en admettant, d'après les données de Pütter [31], qu'une Sangsue à jeun absorbe en moyenne cinq fois son poids de sang. (Le pourcentage, d'après ces deux données, fournit une réponse approximative.)

Lots N°	Poids après alimentation	Poids du sang ($\frac{4}{6}$)	Poids du sang d'après les chlorures	Pourcentages
I	48,67	38,92	16,65	42,7
II	43,35	34,68	16,10	46,4
III	115,57	92,46	44,4	48,02
IV	113,29	90,63	44,92	49,5

On peut donc estimer par le calcul à près de 50 % la quantité de chlorures éliminée dans les six premiers jours qui suivent l'alimentation. Ce fait peut s'expliquer si l'on considère le mode de vie de la Sangsue. La digestion, chez cet animal, demande, en effet, environ trois cents jours (Pütter [31]). La Sangsue n'assimile le sang ingéré que peu à peu et elle lui fait subir, surtout dans les premiers jours, une concentration pour le mettre en réserve.

Signalons enfin que l'excrétion des chlorures pendant l'anaérobiose est sensiblement plus élevée que dans la vie des mêmes Sangsues à jeun. (Maximum 27 mgr.) Ce fait semble être en rapport avec une désassimilation plus élevée des matériaux carbonés provoquée par l'anaérobiose.

C. LES PHOSPHATES.

Les remarques déjà faites au sujet du dosage des chlorures s'appliquent à celui des phosphates et leur quantité très

faible dans les liquides d'excrétion ne nous a pas permis de les doser directement. C'est donc sur le résidu d'évaporation à 60° de 50 cm³ et même 100 cm³ que nous avons opéré.

Technique. — Les phosphates exprimés en P²O⁵ ont été dosés colorimétriquement par la méthode céruléo-molybdique du professeur Denigès qui présente l'avantage d'une grande sensibilité et d'une facile exécution. Le résidu d'évaporation de 50 ou 100 cc³ de liquide a été repris par 10 cc³ d'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acide acétique, afin de précipiter les mucoïdes qui peuvent s'y trouver et qui, par adsorption du phospho-molybdate formé dans la réaction, rendraient la lecture colorimétrique impossible. Les 10 cm³ de liquide obtenu sont versés dans un gros tube Pyrex et centrifugés pendant plusieurs minutes. On décante le liquide surnageant qui doit être parfaitement limpide (dans le cas contraire, il faudrait recommencer une deuxième centrifugation) et on l'introduit dans un gros tube à essais, selon la technique de Denigès [9]. On ajoute dix gouttes de liqueur molybdique, quatre gouttes de liqueur molybdeuse et on porte à l'ébullition qu'on maintient quinze secondes.

On prépare de la même façon un étalon, en diluant convenablement une solution titrée de phosphate disodique pur contenant 100 mgr. de P²O⁵ par litre pour que la comparaison soit faite sur des liqueurs de titres voisins. En général, un étalon, contenant 0 mgr. 025 de P²O⁵, c'est-à-dire correspondant à une prise d'essai de 0 cm³ 25 diluée avec 9 cm³ 75 d'eau ordinaire, pourra être utilisé.

Les deux liquides ainsi obtenus seront comparés au colorimètre de Duboscq. Soit : h, la hauteur de l'étalon, h' celle de l'essai, la quantité de P²O⁵ par litre de liquide examiné sera, en milligrammes (si la prise d'essai était de 100 cc³) :

$$0,025 \times \frac{h}{h'} \times 10 = \text{mgr. P}^2\text{O}^5 \text{ pour 1.000}$$

Les résultats obtenus ont été rapportés dans le tableau suivant :

P ² O ⁵ en mgr. pour 100 gr. de sangsues	Périodes de 48 heures	SANGSUES A JEUN				SANGSUES ALIMENTÉES				SANGSUES en anaérobiose	
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II
	1 ^{re}	0,45	1,09	0,66	0,89	Traces	Traces	0,104	Traces	Non dosable	0,41
	2 ^e	0,74	0,81	0,95	0,83	Traces	Traces	Traces	Traces	0,64	
	3 ^e	0,64	0,57	0,45	0,61	Traces + fortes	Traces + fortes	Traces + fortes	Traces + fortes	0,37	
	4 ^e	0,71	0,54	0,92	0,77	0,074	0,22	0,19	0,26 (7°)	0,206 ⁽¹⁾	
						0,91 (30°)	0,46 (30°)	0,28 (10°)	0,301 (8°)		

En examinant ces résultats, on voit que :

1° Les Sangsues excrètent normalement une petite quantité de phosphates. Cette quantité est sensiblement constante (maximum 1 mgr. 09, minimum 0 mgr. 45) et provient vraisemblablement en majeure partie de la dégradation des nucléoprotéïdes et des lécithines.

2° Il n'a pas été possible de doser les phosphates dans les liquides recueillis deux, quatre et six jours après l'alimentation. Ils y sont néanmoins présents, mais en traces si faibles que la lecture colorimétrique est impossible, le dosage étant cependant fait sur 100 cm³ de liqueur primitive. Huit jours après l'alimentation, ils réapparaissent en quantité plus faible que pendant le jeûne (0 mgr. 22 contre 0 mgr. 92). Ils augmentent ensuite peu à peu, jusqu'à atteindre au bout de quelques semaines les valeurs caractéristiques du jeûne. Des analyses faites deux mois après l'alimentation sur nos deux premiers lots de Sangsues nous ont fournis des résultats comparables à ceux du jeûne (0 mgr. 91 et 0 mgr. 46).

Ces chiffres sont très différents de ceux qui ont été obtenus pour les chlorures, ils semblent inexplicables si on leur applique le principe général suivant lequel les quantités de

(1) Retour à l'aérobiose.

substances éliminées par un être normal en état d'équilibre nutritif sont dans un rapport sensiblement constant. On conçoit mal, en effet, qu'à une chute de l'excrétion des phosphates corresponde une élimination relativement énorme de chlorures.

Le même fait a été cependant observé sur le *Rhodnius Prolixus* par H. Wigglesworth [42]. Aussitôt après l'alimentation de cet insecte, l'urine ne contenait pas de phosphates.

« Ils sont complètement absents pendant les premières vingt-quatre heures. Ils sont présents à l'état de traces très faibles après quarante-huit heures, puis croissent pour rester constants ou tomber un peu dans les derniers moments de la digestion. »

Ajoutons que, d'après l'auteur, le calcium et le magnésium se comportent de la même façon que les phosphates.

H. Wigglesworth [42] a donné l'explication suivante :

« La cause de ces faits, dit-il, n'est pas absolument précise. Bishop, Briggs et Ronzoni (1926) ont trouvé que le sang des larves d'abeilles est beaucoup plus riche en calcium et en magnésium que le sang des mammifères. Il contient une fois et demi plus de calcium et huit fois plus de magnésium. Si le sang du *Rhodnius* a la même composition que celui de la larve d'abeille, cela peut donner la raison de la rétention temporaire de ces substances, car il n'y a presque pas de sang dans l'insecte à jeun, mais une quantité appréciable durant les quelques premières semaines qui suivent la nutrition... »

« Le même argument peut être appliqué aux phosphates qui sont absents de l'urine pendant les premiers moments de la digestion, car les phosphates du sang d'abeille sont dix fois plus élevés que ceux du sang des mammifères. Mais le phosphore appartient aussi à la catégorie des déchets organiques de l'urine, car la plus grande partie du phosphore du sang est sous une forme organique, comme les lécithines, les nucléines, etc., et sera par suite seulement libérée pendant le catabolisme de ces substances... »

D'autre part, nous avons déjà vu que, d'après A. Pütter [31], la Sangsue élabore le sang absorbé pendant deux cents jours

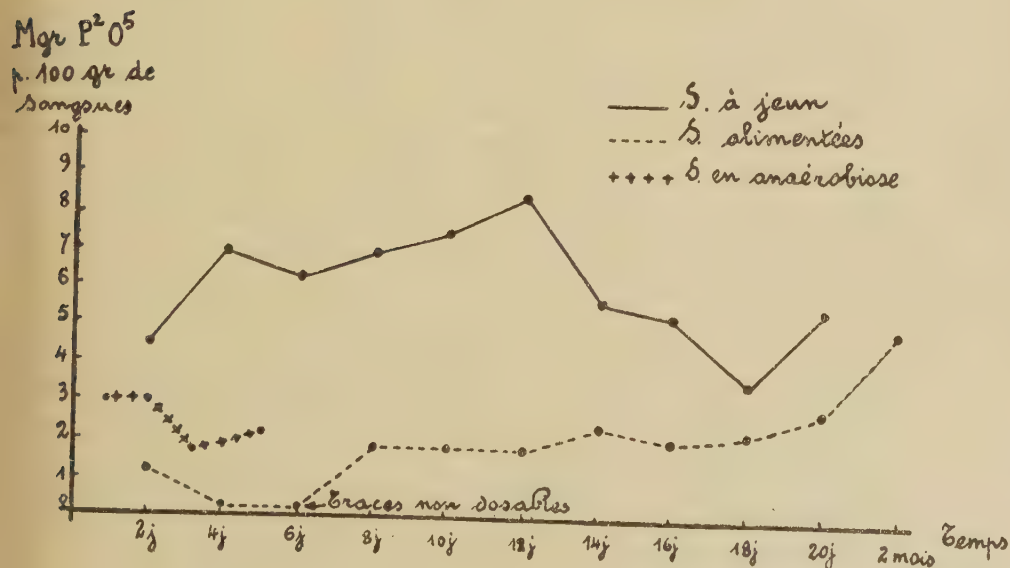
et qu'après deux cents jours l'élaboration de l'aliment est terminée. L'animal utilise encore la matière élaborée. Il excrète alors par jour 3 mgr. 5 d' H^2O et 1 mgr. 2 de substance sèche, puis revient peu à peu à son état primitif.

Il semble, en définitive, que, par analogie avec les Insectes suceurs, l'on puisse attribuer la rétention passagère des phosphates par la Sangsue venant d'être alimentée avec du sang à deux causes :

1° La reformation du sang de l'*Hirudo* qui est probablement beaucoup plus riche en phosphate que celui du Cheval.

2° Le retard dans le catabolisme des lécithines et des nucléoprotéides du sang ingéré, ces substances étant plus difficiles à dégrader que les hydrates de carbone et les graisses.

Nous avons réuni dans le tableau suivant l'excrétion de phosphates se rapportant au lot n° 1 de Sangsues à jeun, au lot n° 3 de Sangsues alimentées et au lot n° 1 de Sangsues en anaérobiose. Pour la clarté du diagramme, les valeurs des phosphates ont été multipliées par 10. La rétention de phosphates après ingestion de sang apparaît nettement.



3° L'anaérobiose a des effets moins sensibles sur l'élimination des phosphates que l'alimentation. Ceux-ci sont excrétés en quantité moins élevée que pendant le jeûne, mais ils restent cependant dosables. Les quelques chiffres que nous avons réunis semblent montrer que la dégradation des substances phosphorées devient de plus en plus difficile à mesure que l'anaérobiose se prolonge, car l'élimination des phosphates baisse notablement. (Voir courbe.)

D. CONCLUSION.

De l'ensemble de nos recherches, il se dégage quelques faits intéressants :

1° Aussitôt après l'alimentation, la réaction ionique des liquides d'excrétion s'abaisse un peu, ce qui semble correspondre à une combustion moins parfaite des acides organiques, malgré l'augmentation des échanges signalés par Jolyet et Regnard [21], etc. 50 % environ des chlorures ingérés avec le sang sont éliminés dans les six jours qui suivent l'alimentation et leur excrétion s'accompagne d'excrétion d'eau, ce qui a pour effet de condenser la masse alimentaire mise en réserve dans le tube digestif. Les phosphates restent indosables pendant les huit premiers jours après l'ingestion du sang, ils augmentent ensuite peu à peu jusqu'à une valeur assez fixe. Un essai d'interprétation de ce curieux phénomène a été tenté.

2° Pendant le jeûne et pendant la période de la fin de la digestion, le pH des liquides d'excrétion est un peu alcalin (7,3 environ), les chlorures sont éliminés en quantité relativement faible et constante, ainsi que les phosphates. (Voir 3.)

3° L'anaérobiose a pour effet d'abaisser considérablement le pH des liquides. On peut attribuer ce fait à plusieurs causes : l'augmentation de la quantité d'acide carbonique dissous dans l'eau, la combustion imparfaite des acides organiques par suite du manque d'oxygène, la diminution des échanges azotés entraînant une chute de l'excrétion d'ammoniaque.

Les chlorures et les phosphates sont éliminés en quantités moins grandes à mesure que se poursuit l'anaérobiose.

CHAPITRE DEUXIÈME

EXCRÉTION AZOTÉE

A. — Historique

Nous avons déjà signalé que Jolyet et Regnard [21], dans leurs « *Recherches sur la respiration des animaux aquatiques* » (1877), ont constaté chez les Sangsues en digestion une forte exhalation d'azote. Cent quatre Sangsues à jeun, pesant ensemble 236 gr., ont été mises dans un appareil destiné à mesurer les quantités d'acide carbonique, d'oxygène et d'azote éliminées, elles n'ont pas exhalé d'azote. Les mêmes Sangsues, remises dans l'appareil après s'être gorgées de sang, ont exhalé en quarante-neuf heures 27 cm³ d'azote.

Voici les conclusions des auteurs :

« On peut constater une exhalation d'azote qui avait été nulle dans l'observation des sangsues à jeun. Il faut toutefois remarquer que le sang resté dans le tube digestif des animaux a pu avoir sa part d'influence dans les phénomènes ci-dessus observés, principalement dans l'exhalation de l'azote ».

A notre connaissance, cette expérience est la seule parue jusqu'à présent sur l'excrétion du gaz azote par la Sangsue.

Nous avons aussi attiré l'attention sur l'élimination de mucus par l'animal, élimination qui entraîne une perte de corps azotés. E. Weinland (1901), résumant les travaux de Pütter à ce sujet, a écrit :

« Comme produits d'excrétion, Pütter a trouvé une substance azotée muqueuse provenant de la peau de l'animal. Tous ensemble, trente animaux en moyenne, qui avaient pris du sang trois mois avant la série d'expérience, ont donné en 88 jours, pour une variation de poids de 76 à 44 gr., 95 mgr. d'N dans le mucus. »

On sait que l'appareil excréteur de l'*Hirudo officinalis* est formé de dix-sept paires de néphridies. Ce sont des entonnoirs vibratiles s'ouvrant dans les sinus latéraux dépendant de la lacune ventrale. Ils forment des tubes pelotés et leur ouverture est un pore situé sur le dernier sillon de chaque segment ou somite correspondant.

Deux méthodes ont été employées pour étudier les produits d'excrétion de la Sangsue : la première consiste en des recherches chimiques et histo-chimiques en vue d'identifier la nature des granulations d'excrétion que renferment les néphridies et les tissus excrétophores ; la seconde est une méthode indirecte qui, du reste, donne les résultats les plus intéressants. L'excrétion de la Sangsue étant très diffuse, pour capter les déchets, on fait vivre l'animal dans de l'eau de source, ou mieux de l'eau distillée, et l'on soumet à l'analyse les liquides contenant les excréta. Nous allons brièvement passer en revue les résultats dus à chacune de ces méthodes.

Les premiers travaux en date sont ceux de Griffiths (1887).

L'auteur a recueilli le liquide néphridien d'un grand nombre de Sangsues. Il a trouvé dans la portion dilatée en ampoule des organes segmentaires une substance gélatineuse et blanchâtre constituée (au microscope) par de nombreux globules et de fins cristaux. Le liquide a été traité par une solution chaude de soude diluée. En ajoutant de l'acide chlorhydrique, il s'est formé un léger précipité floconneux constitué au microscope par divers cristaux. Ces cristaux, additionnés d'acide azotique et d'ammoniaque, ont donné la réaction de la murexide, ils sont, en outre, solubles dans une solution de carbonate de soude. Au liquide néphridien, Griffiths [19] a ajouté de l'eau bouillante et évaporé le liquide à siccité. Le résidu,

additionné d'alcool absolu, a été de nouveau évaporé. Il a ajouté de l'eau bouillante et, après filtration, de l'acide acétique. Après repos, il dit avoir obtenu des cristaux d'acide urique.

Marchal [27] a repris ces recherches en 1889 et n'a pu confirmer les résultats de Griffiths [19].

Le liquide trouble retiré par ponction des organes segmentaires et évaporé sur une lame de verre n'a pas donné, par addition d'acide azotique et d'ammoniaque, la réaction rouge de la murexide, mais une teinte orangée banale et sans signification. L'examen microscopique décèle des cristaux en aiguilles assez semblables à ceux de la leucine. Dans l'extrait des néphridies, Marchal n'a pas trouvé d'acide urique, mais il signale dans l'extrait alcoolique la présence d'ammoniaque et de triméthylamine et d'un alcaloïde, peut-être la leucomaïne.

En 1889, on savait donc seulement qu'il n'y avait pas d'acide urique dans le liquide néphridien de la Sangsue.

C'est seulement à partir de 1901 que l'on trouve dans les travaux de A. Pütter des recherches chimiques et physiologiques sur la répartition de l'azote dans l'eau où ont vécu les Sangsues.

Cet auteur a étudié le comportement des animaux en vie normale et en anaérobiose. Ses recherches ont porté sur les liquides d'excrétion débarrassés du mucus. Voici ses conclusions, rapportées par A. Weinland [41] et par A. Burian [5] :

« Comme produits d'excrétion, Pütter a trouvé... beaucoup d'ammoniaque. Il n'a trouvé ni urée, ni acide urique... Tous ensemble, 30 animaux en moyenne qui avaient pris du sang trois mois avant les essais, ont donné en 88 jours pour une variation de poids de 76 à 44 gr., 707 mgr. d'N, dont 364 mgr. d'ammoniaque (40 à 67 % de l'azote excrété). »

Pütter a aussi étudié la répartition de l'azote dans l'eau où avaient vécu 300 Sangsues pendant cent heures, après avoir pris soin d'éliminer le mucus. Il a trouvé 80 mgr. d'N total

et 1 mgr. d'N purique. Pas de traces d'acide urique, pas d'urée. Présence de créatinine en quantité notable (réaction positive). En particulier, il a mis bien en évidence l'excrétion d'ammoniaque. Elle atteint 40 à 60 % parfois, jusqu'à 75 % de l'excrétion totale (la triméthylamine étant comptée comme ammoniacque d'après Marchal). La part appartenant à l'ammoniacque est plus petite lorsque les animaux vivent sans oxygène. Celle-ci s'abaisse à 7 ou 8 % en général, mais, à l'occasion aussi, encore plus bas.

Pütter n'a pu mettre en évidence un changement dans la quantité d'azote excrété par les Sangsues soumises à l'anaérobiose, sous l'influence d'une élévation ou d'un abaissement de température, à cause de la faible durée de ses expériences.

Il conclut que la Sangsue a surtout un métabolisme protidique ; elle utilise environ par jour et kilo 14 calories 5 provenant de 2 mgr. 45 d'albumine pendant l'assimilation et 5 calories 92 provenant de 1 mgr. d'albumine à jeun. La dégradation, l'oxydation ou l'hydrolyse des hydrates de carbone et des graisses n'atteignent pas 1 calorie par jour dans l'un et l'autre cas.

En 1908, Spiess [36] a signalé que les inclusions des cellules bothryoïdales seraient formées surtout d'un urate soluble dans l'extrait aqueux obtenu par évaporation de 50 litres d'eau dans lesquels ont séjourné pendant plusieurs semaines 1.400 à 1.500 Sangsues ; il dit avoir trouvé de l'acide urique en se basant sur la réduction par l'extrait aqueux de $\text{NO}^3 \text{Ag}$ par addition de carbonate de soude, mais cette réaction est bien peu probante.

En 1913, R. Fosse [15] a caractérisé l'urée dans l'extrait alcoolique et dans les suc cellulaires débarrassés des protéines de la Sangsue, grâce à la combinaison spécifique de l'urée avec le Xanthidrol. Il a aussi obtenu la combinaison dixanthylée dans l'eau de source où ont vécu des Sangsues.

En 1926, St. J. Przylecki [32], en maintenant des Sangsues dans l'eau distillée à 22°, a trouvé, par vingt-quatre heures et pour 100 gr. de poids, 13 mgr. 2 d'azote total, dont 76 %

sous forme d'ammoniaque. Lorsque les animaux sont placés dans de l'eau faiblement alcaline (contenant de 0,1 à 0,2 % de carbonate de soude), l'excrétion de l'azote total est diminuée et le rapport de l'azote ammoniacal à l'azote total est inférieur à 76 %.

L'auteur conclut que :

« Le mécanisme régulateur de l'excrétion ammoniacale s'effectue sur les mêmes principes chez les différents types d'animaux (vertébrés, vers, mollusques) et que chez un grand nombre d'invertébrés il existe un mécanisme réglant l'équilibre acide base du milieu interne de l'animal. »

Przylecki a encore étudié la répartition et la dégradation de l'acide urique chez la Sangsue au cours de recherches plus étendues chez les Invertébrés. Il n'a pas trouvé d'acide urique dans les tissus et dans l'eau où *Hirudo* avait séjourné pendant deux mois. Il a vu que l'acide urique injecté dans l'intestin ou sous la peau des animaux vivant à jeun est excrété en totalité pendant les 48-96 heures qui ont suivi l'injection et que l'addition d'acide urique aux tissus broyés ou aux animaux vivants n'a provoqué ni une augmentation d'ammoniaque ou de corps aminés, ni la formation d'urée.

Enfin, il a signalé que *Hirudo* ne dégrade pas et ne forme jamais d'allantoïne dans les conditions normales, ni après l'injection d'acide urique, qu'il n'y a donc pas d'allantoïnase chez *Hirudo* et que l'addition de guanine, d'adénine ou de xanthine ne provoque pas la formation d'acide urique (absence de xanthinoxydase).

En 1928, dans ses « *Recherches biochimiques sur l'excrétion azotée des Invertébrés* », H. Delaunay [6] a donné un tableau d'ensemble de l'excrétion azotée chez la Sangsue.

Dans les liquides d'excrétion, l'auteur a trouvé p. 100 d'azote total non protéique :

1° Pour les Sangsues à jeun : 77 à 79 % d'azote ammoniacal ; 3,5 à 5,5 % d'azote aminé ; 3,5 à 4,2 % d'azote uréique ; 3,5 à 5,2 % d'azote purique : pas d'acide urique.

2° Pour les *Sangsues alimentées* : 71 à 78 % d'azote ammoniacal ; 0,6 à 3,3 % d'azote aminé ; 4 à 10 % d'azote uréique ; 2 à 3,8 % d'azote purique ; pas d'acide urique ou des traces.

Voici les conclusions de cet auteur :

« Le fait le plus important... est conforme aux données antérieures de A. Pütter, de Bialaczewicz et de Przylecki. L'azote volatil titrable au formol représente, en effet, 70 à 80 % de l'azote total excrété. Il est probable que l'ammoniaque forme la majeure partie de l'azote volatil, mais les recherches de Marchal laissent supposer que la part à attribuer à l'azote des amines n'est peut-être pas négligeable. De nouvelles recherches sont nécessaires pour fixer ce point.

« L'excrétion d'azote aminé est inférieure à 5 %... Cela semble indiquer que les processus d'excrétion chez la Sangsue sont plus parfaits que ceux de beaucoup d'invertébrés, l'excrétion d'azote aminé pouvant être considérée comme une perte pour l'organisme.

« L'excrétion d'urée n'est pas nulle comme l'a avancé Pütter, mais elle est très faible, correspondant seulement à 4 % de l'azote total, chez les animaux à jeun. Aussitôt après l'alimentation en sang, l'excrétion uréique a été plus marquée (10 %), mais il est probable que la plus-value a eu pour cause l'excrétion de l'urée absorbée avec le sang, car elle n'a pas persisté, alors que les animaux étaient encore en pleine digestion.

« L'excrétion purique a varié de 2 à 5 %, ce qui semble bien démontrer que chez les Sangsues, comme d'ailleurs chez les autres vers, les composés puriques ne se forment pas par synthèse à l'aide des déchets du métabolisme protéique. Enfin, comme l'avait bien vu Marchal, l'acide urique n'est pas un déchet normal de la Sangsue. On peut toutefois en rencontrer des traces dans l'eau contenant les produits d'excrétion, mais surtout lorsque les animaux viennent d'être alimentés avec du sang, ce qui laisse supposer que, comme pour l'urée, il s'agit de l'excrétion de l'acide urique ingéré avec le sang. »

B. — Recherches

1° TECHNIQUE

Dans les liquides d'excrétion de Sangsues, à jeun, alimentées et en anaérobiose, nous avons dosé l'azote total non protéique, l'azote ammoniacal, l'azote aminé et l'azote de la créatinine.

La partie originale de notre travail porte sur le dosage de ce dernier corps dont la présence avait été signalée par Pütter.

Azote total non protéique

Les liquides d'excrétion des divers lots de Sangsues ont été filtrés pour en éliminer le mucus et essayés au réactif de Tanret pour la recherche de l'albumine qui doit être négative. Sur 50 cm³ de liquide, on dose l'azote total selon la microméthode de Delaunay, dont on trouvera l'exposé dans le *Précis de Chimie analytique* de Denigès, Chelle et Labat, t. II, p. 64.

50 cm³ de liquide sont introduits dans un ballon Kjeldhal (Pyrex) de 200 cm³ et l'on ajoute 2 cm³ d'un mélange à parties égales d'acide sulfurique pur et d'une solution à 1 % de sulfate de cuivre. Le mélange est chauffé sous la hotte et l'on cesse de chauffer une demi-heure environ après décoloration.

Après refroidissement, le liquide sulfurique est additionné de 20 cm³ d'eau distillée, de phtaléine (X gouttes) et refroidi de nouveau. On ajoute ensuite de la lessive de soude jusqu'à coloration rouge persistant dix secondes, le matras étant immergé dans l'eau froide. Par distillation, on isole l'ammoniaque qui est recueillie dans quelques cm³ d'H CL $\frac{N}{20}$ et titrée au formol. Il est nécessaire de tenir compte de la petite quantité d'ammoniaque apportée par les réactifs, quantité que l'on doit déterminer par une opération à blanc et que l'on retranchera chaque fois de la valeur trouvée dans l'essai. On calcule la quantité d'azote dans 50 cm³ de liquide par la liqueur titrée de baryte N/46,6, sachant que 1 cm³ de liqueur barytique correspond à 3 mgr. d'N, en prenant soin de retrancher la valeur du témoin à blanc.

Le calcul est le suivant : soit N le volume de liqueur barytique $\frac{N}{46,6}$ employés lors du dosage et n le volume du témoin :

$$(N - n) \times 0,3 = \text{mgr. d'azote pour } 50 \text{ cm}^3$$

Azote aminé libre et azote volatil titrable au formol

Nous avons utilisé la méthode de H. Delaunay dont on trouvera le détail dans le *Précis de Chimie analytique* de G. Denigès et la méthode de Yovanovitch par entraînement par la vapeur d'eau dans une atmosphère raréfiée.

Pour séparer l'azote aminé de l'azote ammoniacal, on utilise un appareil à barbotage construit suivant les indications de Folin.

Le résidu d'évaporation de 50 cm³ de liquide d'excrétion, additionnés de quelques gouttes de solution à 5 % d'acide trichloracétique avant l'évaporation pour empêcher la perte d'ammoniaque (voir exposé général des techniques), est repris par 5 cm³ environ d'eau distillée que l'on verse dans un tube Pyrex de gros calibre.

Nous avons employé, pour déplacer les corps ammoniacaux volatils, une solution de carbonate de lithine, de préférence à la solution saturée de baryte utilisée jusqu'alors par H. Delaunay, car le pouvoir hydrolysant du carbonate de lithine vis-à-vis des corps azotés est considéré comme nul.

Aux 5 cm³ versés dans le tube Pyrex, on ajoute de la phtaléine, 2 ou 3 cm³ d'alcool à 90° qui facilite la distillation et, goutte à goutte, la solution saturée de carbonate de lithine jusqu'à virage au rouge, plus quelques gouttes pour parfaire l'alcalinisation. Les vapeurs ammoniacales sont entraînées par aspiration d'air par la trompe à eau à une température n'excédant pas 45°. On les recueille dans quelques cm³ d'HCL $\frac{N}{20}$.

L'ammoniaque est entièrement entraînée en une heure à condition que sa teneur dans le liquide soit faible.

Le dosage de l'ammoniaque s'effectue, comme pour l'azote total, par microdosage au formol à l'aide de la liqueur titrée barytique dont 1 cm³ correspond à 3 mgr. d'N.

Si N cm³ est le volume de liqueur barytique nécessaire pour obtenir la teinte rose de la phtaléine, la quantité d'azote ammoniacal pour 50 cc³ de liquide d'excrétion sera :

$$n \times 0,3 \times 10 = \text{mgr. d'azote pour } 500 \text{ cm}^3$$

L'azote aminé est fixe, il est donc contenu dans le liquide restant dans le tube Pyrex. Il a été dosé au formol suivant les indications de Sørensen jusqu'à virage au rouge franc à la phtaléine, après traitement par une solution saturée d'hydroxyde de baryum ajoutée en excès pour précipiter les carbonates, phosphates, etc.

Le calcul de l'azote aminé est le même que plus haut.

Créatinine

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique de Folin après lui avoir fait subir quelques modifications en vue d'éliminer certaines causes d'erreur.

Le principe de la méthode est celui-ci :

Une solution de dichromate de potassium à 24 gr. 54 par litre, c'est-à-dire $\frac{N}{20}$ examinée sous une épaisseur de 8 mm., a le même pouvoir colorant qu'une solution obtenue en dissolvant 0 gr. 10 de picrique à 1 ou 2 % et 5 cm³ de solution d'hydroxyde de sodium créatinine dans 10 cm³ d'eau, ajoutant 15 cm³ d'une solution d'acide caustique à 10 %, puis, après mélange et contact de cinq à dix minutes, complétant à 500 cm³, solution examinée au colorimètre de Duboscq sous une épaisseur de 8 mm. » (*Précis de Chimie analytique* de DENIGÈS, CHELLE et LABAT.)

La solution de dichromate de potassium employée comme témoin a l'inconvénient de donner une coloration rouge orangé différente de celles que nous avons obtenues avec l'acide picrique et l'hydroxyde de sodium sur le résidu d'évaporation de nos liquides. Aussi, après plusieurs essais infructueux, avons-nous utilisé la technique recommandée par Laudat [24] pour le dosage de la créatinine dans le sérum sanguin qui consiste à faire une solution étalon de créatinine pure, dont une prise d'essai, destinée à servir de témoin, sera traitée de la même façon que le liquide à analyser.

RÉACTIFS. — 1° *Solution titrée de créatinine à 1 gr. pour 1.000.* — On dissout 1 gr. de créatinine pure « Roche » au moyen de quelques cm³ d'eau distillée dans un ballon jaugé de 1.000 cm³. On ajoute 10 cm³ d'acide chlorhydrique N, cinq

gouttes de toluène et on complète à 1.000 cm³ avec de l'eau distillée. Le toluène assure la bonne conservation de solution.

2° *Solution saturée d'acide picrique pur.* — L'acide picrique est soluble dans quatre-vingt-six parties d'eau à 15° et dans vingt-six parties d'eau à 77°. Pour purifier l'acide picrique du commerce, on procède par cristallisations successives. Une certaine quantité d'acide est dissoute dans de l'eau distillée bouillante et cristallise par refroidissement. Le liquide surnageant est décanté et le résidu repris par l'eau distillée bouillante. On répète cette opération jusqu'à obtention des cristaux en longues aiguilles caractérisant l'acide picrique pur (trois cristallisations au moins sont nécessaires). On décante alors l'eau et on fait sécher les cristaux à l'étuve à 30°.

La solution saturée est préparée en dissolvant une partie d'acide picrique dans vingt parties d'eau distillée bouillante. Par refroidissement, il y a cristallisation de l'excès d'acide.

3° *Lessive d'hydroxyde de sodium pure décarbonatée.*

Technique du dosage. — Dans un premier ballon jaugé de 20 cm³, on met, au moyen d'une pipette de 2 cm³ graduée

$\frac{1}{10^0}$, 0 cc³ 20 de solution de créatinine pure à 1 gr. 0/00, 2 cc³ de solution saturée d'acide picrique et trente gouttes de lessive d'hydroxyde de sodium. Après dix minutes de contact, on complète à 20 cc³ avec de l'eau distillée. Dans un second ballon jaugé de 20 cc³ également, on verse le résidu d'évaporation de 50 cc³ de liquide d'excrétion repris par quelques cc³ d'eau distillée dans la capsule qui le contient, 2 cc³ de solution saturée d'acide picrique et vingt gouttes de lessive d'hydroxyde de sodium. On complète également à 20 cc³ avec de l'eau distillée après dix minutes de contact.

Les deux liquides sont comparés au colorimètre de Dubosq sous une épaisseur de 20 millimètres pour la solution étalon de créatinine.

Calculs. — La prise de 0 cc³ 20 de liqueur titrée de créatinine à 1 gr. 0/00 correspond à 0 mgr. 20 de créatinine.

Soit h la hauteur de l'étalon et h' celle de l'essai ; la quantité

de créatinine contenue dans 50 cm³ de liquide d'excrétion sera, en milligrammes :

$$0 \text{ mgr. } 2 \times \frac{h}{h'} = \text{créatinine en mgr. pour } 50 \text{ cm}^3$$

$$0 \text{ mgr. } 2 \times \frac{h}{h'} \times 10 = \text{créatinine en mgr. pour } 500 \text{ cm}^3$$

Le poids d'azote contenu dans la créatinine étant les $\frac{371}{1000}$ du poids de cette créatinine, on calculera ainsi l'azote-crétinine de 500 cm³ :

$$0 \text{ mgr. } 2 \times \frac{h}{h'} \times 10 \times 0,371 = N \text{ créatinine par mgr. pour } 500 \text{ cm}^3.$$

Créatine

Par hydrolyse de la créatine, on obtient quantitativement de la créatinine. Si après hydrolyse on dose la créatinine dans le liquide qui la contient, on trouve la somme créatine + créatinine préformée. La créatine seule se calcule par différence entre cette somme et le chiffre trouvé pour la créatinine dosée précédemment.

Pour hydrolyser la créatine du sérum sanguin, Laudat recommande la technique suivante : Mettre dans un tube à essai : 2 cm³ de filtrat trichloracétique (1 partie de sérum pour 2 parties d'ac. trichloracétique), 0 cm³ 6 NaOH 10 %, 2 cm³ 4 H²O et 1 cm³ HCl N. Fermer l'ouverture du tube par une feuille de papier filtre et porter à l'autoclave à 18° pendant vingt minutes.

Pour hydrolyser la créatine dans les liquides contenant les excréta d'*Hirudo*, nous avons repris par 2 cm³ d'eau distillée le résidu d'évaporation de 50 cm³ de liquide filtré et additionné de quelques gouttes d'acide trichloracétique à 10 %, et nous avons opéré l'hydrolyse suivant la technique de Laudat.

La créatine hydrolysée fournit quantitativement de la créatinine que l'on dose par la méthode colorimétrique habituelle.

Plusieurs dosages ainsi effectués sur les liquides contenant les excréta d'*Hirudo* nous ont donné, pour la somme créatine + créatinine préformée, des chiffres égaux ou même

inférieurs à ceux trouvés, sur ces mêmes liquides, pour la créatinine préformée seule. Dans les liquides examinés, il n'y avait donc pas de créatine. C'est pour cette raison que nous avons limité notre étude au dosage de la créatinine.

2° DONNÉES EXPÉRIMENTALES

Nos résultats ont été calculés pour 100 gr. de Sangsues vivant dans 500 cm³ d'eau distillée pendant quarante-huit heures, comme nous l'avons déjà dit. Pour les Sangsues en anaérobiose seules, nous avons indiqué, en face de chaque analyse, le temps pendant lequel elles ont vécu dans le même liquide.

I. — Sangsues à jeun.

Lots N°		N EN Mgr. POUR 100 Gr. DE SANGSUES EN 48 HEURES				POURCENTAGES			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
N non protéique Total	Max.	22,50	28,34	30,70	28,42	—	—	—	—
	Moy.	16,87	19,42	19,69	19,67	—	—	—	—
	Min.	13,92	15,36	12,15	14,76	—	—	—	—
N. Ammoniaque	Max.	16,07	18,92	21,10	20,45	68,0	66,7	68,7	71,8
	Moy.	12,67	13,31	14,13	14,87	75,0	68,5	72,06	79,6
	Min.	9,27	12,40	8,95	11,32	66,6	80,7	73,00	76,7
N aminé	Max.	1,07	1,81	1,91	1,28	4,75	6,3	6,22	4,5
	Moy.	0,71	0,95	1,27	1,04	4,28	4,89	6,44	5,31
	Min.	Traces	Traces	0,63	0,52	—	—	5,14	3,67
N créatinine	Max.	4,03	5,83	2,51	3,54	17,8	20,5	8,19	12,4
	Moy.	2,31	3,45	2,14	2,71	13,6	17,7	10,86	13,7
	Min.	1,20	1,99	1,42	2,10	8,2	12,9	11,7	14,2
N dosé		21,17	26,56	25,52	25,27	90,65	93,5	83,01	88,7
		15,69	17,71	17,60	18,72	87,48	91,09	89,36	98,6
		10,47	14,39	11,0	13,94	74,8	93,6	89,84	94,57
N indosé		1,33	1,78	4,18	3,15	9,35	6,5	16,99	11,3
		1,18	1,61	2,09	0,95	12,52	8,91	10,64	1,4
		3,45	1,07	1,15	0,82	25,2	6,4	10,16	5,43

Les lots I et II ont été étudiés simultanément, ainsi que les lots III et IV.

L'examen de ce tableau montre que :

1° L'excrétion moyenne d'azote non protéique total pour 100 gr. de Sangsues pendant quarante-huit heures s'établit vers 17 mgr. — 19 mgr. 5.

2° L'azote ammoniacal représente 68,5 à 79,6 centièmes de l'azote non protéique total.

3° L'azote dû aux acides aminés forme les 4 à 6 centièmes de l'excrétion azotée totale.

4° L'azote dû à la créatinine en représente 10 à 17 centièmes.

II. — *Sangsues alimentées.*

Nous n'avons pas donné pour les quatre lots examinés les excrétions maxima, minima et moyennes qui ne présentent ici qu'un intérêt secondaire. En effet, il était surtout important d'étudier l'excrétion azotée dans les premiers jours qui suivent l'alimentation. L'étude de l'excrétion minérale nous a déjà montré l'intérêt des analyses faites aussitôt après l'ingestion de sang. Les résultats, pour les déchets azotés, sans être aussi nets, sont néanmoins intéressants.

L'étude des lots I et II, des lots III et IV a été faite simultanément.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU N° II

	Périodes de 48 h. après l'alimentation	Mgr. N pour 100 gr.		Rapports à 100 N. T.	
		N° I	N° II	N° I	N° II
N non protéique total	—	—	—	—	—
	1 ^e	49,6	46,3	—	—
	2 ^e	—	36,03	—	—
	5 ^e	45,6	36,03	—	—
	6 ^e	30,04	—	—	—
N ammoniacque ..	1 ^e	27,2	29,6	54,90	63,9
	2 ^e	—	26,4	—	73,3
	5 ^e	34,4	28,4	75,4	78,9
	6 ^e	20,0	—	66,5	—
N aminé	1 ^e	0,8	1,72	1,61	2,79
	2 ^e	—	2,58	—	2,39
	5 ^e	0,8	1,72	1,75	2,39
	6 ^e	1,6	—	5,26	—
N créatinine	1 ^e	3,68	3,62	7,4	7,81
	2 ^e	—	2,32	—	6,43
	5 ^e	2,72	2,13	5,9	8,68
	6 ^e	3,60	—	11,4	—
N dosé	1 ^e	31,4	34,9	63,9	74,5
	2 ^e	—	31,3	—	82,1
	5 ^e	37,9	33,2	81,6	89,9
	6 ^e	25,2	—	81,6	—
N indéterminé ..	1 ^e	18,2	11,4	36,1	25,5
	2 ^e	—	4,73	—	17,9
	5 ^e	7,7	2,83	18,4	10,1
	6 ^e	4,84	—	18,4	—

TABLEAU N° III

	Périodes de 48 h. après l'alimentation	Mgr N pour 100 gr.		Rapports ‰	
		N° III	N° IV	N° III	N° IV
		—	—	—	—
N non protéique total	1 ^e	52,5	39,6	—	—
	2 ^e	22,5	16,9	—	—
	7 ^e	44,4	38,6	—	—
N ammoniacque ..	1 ^e	22,05	20,7	40,00	52,2
	2 ^e	13,38	13,6	59,4	80,5
	7 ^e	34,28	33,9	77,0	87,0
N aminé	1 ^e	3,75	1,88	7,14	4,74
	2 ^e	1,60	1,25	7,14	7,39
	7 ^e	3,20	2,35	7,2	6,09
N créatinine	1 ^e	2,75	2,11	5,23	5,32
	2 ^e	2,25	1,74	10,0	10,29
	7 ^e	2,03	2,22	4,57	5,75
N dosé	1 ^e	28,55	24,69	52,37	62,26
	2 ^e	17,23	16,59	76,51	98,18
	7 ^e	39,51	38,47	88,77	98,84
N indéterminé ..	1 ^e	23,95	14,91	47,63	37,74
	2 ^e	5,27	0,31	23,49	1,82
	7 ^e	4,95	0,13	11,23	1,16

De l'examen de ces deux tableaux, il ressort que :

1° Quarante-huit heures après l'alimentation, il y a une élimination azotée plus élevée, correspondant à une activité plus intense des Sangsues. Cette élimination baisse beaucoup dans les quarante-huit heures suivantes et se stabilise ensuite. Les valeurs d'azote non protéique total restent néanmoins beaucoup plus élevées que pendant le jeûne (30 à 45 mgr. par

quarante-huit heures pour les 5^e, 6^e et 7^e périodes), c'est-à-dire dix à quatorze jours après l'ingestion de sang.

2° Pendant les quarante-huit heures qui suivent l'alimentation, le pourcentage d'azote ammoniacal est très inférieur aux chiffres donnés par les auteurs (40 à 63 % pour 71 à 78 %). Ce pourcentage augmente, du reste, aussitôt et se stabilise aux environs de 75 %.

3° L'azote aminé représente de 2 à 7 % de l'azote total. Son pourcentage est nettement plus élevé dans le cas des Sangsues n^{os} III et IV que dans celui des Sangsues n^{os} I et II. Peut-être ceci est-il en rapport avec l'augmentation de la température du laboratoire. Celle-ci était de 15° pendant la durée des premières expériences (I et II) (avril) et de 21° (mai) pour les lots III et IV.

4° L'azote de la créatinine subit des variations assez faibles et représente 5 à 10 % de l'azote total.

5° On note dans les premiers jours après l'alimentation une très forte augmentation de l'azote indéterminé qui atteint 37 et même 47 % dans le cas des Sangsues du lot n° III. Cette augmentation est probablement due à l'excrétion de l'urée absorbée avec le sang, car elle ne persiste pas.

III. — *Sangsues en anaérobiose*

Pour l'anaérobiose, nous avons utilisé deux lots de Sangsues alimentées depuis soixante-sept et quarante-six jours.

Le lot n° I, alimenté depuis soixante-sept jours, a beaucoup mieux supporté l'anaérobiose que le lot n° II, alimenté depuis quarante-six jours seulement. Aussi ne donnons-nous les résultats trouvés pour ce dernier lot qu'à titre documentaire, car on ne peut tirer aucune conclusion biologique certaine d'une seule analyse.

Rappelons que, pour le lot n° II, le 2^e liquide seul a été analysé ; pour le lot n° I, le 2^e et 3^e liquides, puis, toujours sur ce même lot, remis en aérobiose, le 4^e et le 5^e liquides, de 500 cm³ chacun, ont été réunis pour l'analyse. Tous ces

liquides étaient limpides, incolores et ne contenaient pas d'albumine.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU N° IV

	Périodes	Mgr. N pour 100 gr.		Rapport o/o	
		N° I	N° II	N° I	N° II
N non protéique total	24 h.	7,10		—	
	24 h.	7,10	9,64	—	—
	48 h.(1)	33,94		—	
N ammoniacque	24 h.	3,94		55,5	
	24 h.	5,52	7,23	77,7	75,0
	48 h.(1)	19,73		58,1	
N aminé	24 h.	1,36		19,1	
	24 h.	0,57	0,401	8,1	4,16
	48 h.(1)	5,52		16,26	
N créatinine..	24 h.	1,17		17,8	
	24 h.	0,61	1,98	8,6	20,5
	48 h.(1)	1,31		3,8	
N dosé	24 h.	5,11		92,4	
	24 h.	6,13	9,61	94,4	99,6
	48 h.(1)	26,56		78,16	
N indéterminé	24 h.	1,99		7,6	
	24 h.	0,97	0,03	5,6	0,4
	48 h.(1)	7,38		21,84	

(1) Retour à la vie aérobie.

Pour le lot n° I, les pH ont été respectivement 5,6, 5,5, 7,1.

Pour le lot n° II, — — — — — 5,5,

L'examen de ce tableau montre plusieurs faits intéressants :

1° Une baisse énorme de l'élimination azotée totale : 100 gr. de Sangsues éliminent en vingt-quatre heures 7 à 9 mgr. d'azote non protéique. (L'élimination normale étant pour les Sangsues à jeun de 17 à 19 mgr. pour 100 gr.) Pendant les quarante-huit heures qui suivent l'anaérobiose, cette élimination redevient beaucoup plus élevée, elle atteint près de 34 mgr.

2° Il semble qu'il y ait un ralentissement de l'excrétion ammoniacale (55 à 78 %). Nous rapprochons plus loin ce fait de l'élévation simultanée de l'acidité ionique mise en valeur par les chiffres du pH = 5,6, 5,5.

3° L'azote des acides aminés constitue une part importante de l'azote total. Ce fait paraît normal si on le rapproche de la baisse de l'azote ammoniacal. L'ammoniaque se formant en grande partie par désamination des acides aminés, il est permis de penser que la difficulté des oxydations et même leur impossibilité, pendant l'anaérobiose, est la cause de l'excrétion plus grande des acides aminés.

4° L'élimination de la créatinine s'abaisse aussi, par suite de la réduction du métabolisme azoté. Toutefois, ce fait n'est devenu sensible qu'après quarante-huit heures d'anaérobiose.

C. — Conclusions

Après avoir exposé nos recherches sur l'excrétion d'ammoniaque, d'acides aminés et de créatinine chez la Sangsue, il nous reste maintenant à comparer nos résultats à ceux des auteurs déjà cités et à essayer, par un examen critique de toutes ces données, d'en dégager la signification biologique.

Dans le tableau suivant, on trouvera les quantités exprimées en milligrammes d'azote non protéique total éliminé par 100 gr. de Sangsues en quarante-huit heures, ainsi que les pourcentages des divers constituants de cet azote. Comme terme de

comparaison, nous avons indiqué les quantités de matières azotées éliminées par l'homme en les rapportant aussi à 100 gr. et quarante-huit heures.

SANGSUES (100 gr.)				HOMME (100 gr. mat. vivante)
	à jeun (Moyenne)	alimentées	anaérobies	
N non protéique. total	18 mgr. 9	36 à 52 ^{mgr}	14 mgr. 2	40 à 60 mgr.
N (NH ³)	7,2 %	40 à 80 %	55,5 %	4 à 5 %
N (NH ²)	5,2 %	1,6 à 7,3 %	—	1 à 2,0 %
N créatinine	13,9 %	5,2 à 11,4 %	13,2 %	2,0 à 2,5 %
N urée	3,8 %	4,0 à 10,0 %		80 %
N purique	4,3 %	2,0 à 3,8 %		
N acide urique ..	0	0	0	
N indosé	0,8 %	47,2 % et au-dessous		6 %

1° Azote non protéique total

La Sangsue élimine de 18 à 52 mgr. d'azote organique soluble pendant quarante-huit heures et pour 100 gr. en vie normale. Si l'on rapproché ces chiffres de ceux de l'homme dans les mêmes conditions (40 à 60), on voit que les échanges azotés de la Sangsue sont relativement actifs pour un Invertébré. Pütter a d'ailleurs montré que l'*Hirudo* a un *métabolisme essentiellement protidique*, ce qui s'explique étant donnée la nature de son alimentation. Cet auteur ajoute que 57 centièmes de l'énergie totale sont produits par les oxydations. La Sangsue étant aérobie, la baisse de l'excrétion azotée pendant l'anaérobiose montre que cet animal, privé d'oxygène, oxyde mal les protéines et que celles-ci sont surtout utilisées par des processus d'oxydation.

L'alimentation a pour effet d'augmenter immédiatement les oxydations de l'animal et, par suite, l'élimination des déchets azotés. Il est probable que, dans les premiers jours qui suivent l'alimentation, l'élaboration du sang ingéré (excrétion d'eau, de chlorures, etc.) représente un travail qui se traduit par des

oxydations plus actives des protéines. Cette période d'activité plus intense se poursuit pendant cent à deux cents jours d'après Pütter, puis l'animal revient peu à peu aux échanges ralentis qui caractérisent le jeûne.

2° Ammoniaque

L'azote de l'ammoniaque représente, selon les cas, 40 à 80 % de l'azote total excrété. Ce rapport est beaucoup plus faible dans l'urine de l'homme où le chiffre moyen normal est d'environ 4,5 %. Il peut cependant s'élever à 20 % et plus dans les états d'acidose.

La forte excrétion ammoniacale de la Sangsue, déjà étudiée par Pütter, Przylecki, Bialaszewick et H. Delaunay, a été interprétée de diverses façons.

Pour Przylecki, l'ammoniaque est excrétée dans la mesure où elle sert à neutraliser les acides non comburés qui prennent naissance au cours des échanges. Se basant sur la fonction neutralisatrice de l'ammoniaque chez les Vertébrés, cet auteur a étudié les variations de l'excrétion ammoniacale en plaçant des Sangsues dans des solutions acides ou alcalines : l'ammoniaque diminue notablement quand les animaux sont placés dans une solution alcaline ($\text{CO}^3 \text{Na}^3$ 0,10 à 0,20 %). Il en a conclu que :

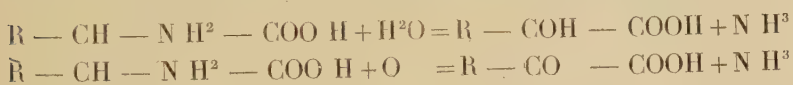
« Le mécanisme régulateur de l'excrétion ammoniacale se base sur les mêmes principes chez les différents types d'animaux (vertébrés, vers, mollusques) et un grand rôle est réservé, dans ce problème, à l'alimentation dont les cendres sont plus ou moins acides. »

H. Delaunay, tout en admettant que le maintien de l'équilibre acide-base peut influencer l'excrétion ammoniacale, a donné une autre explication. D'après cet auteur, la Sangsue se comporte comme les Invertébrés aquatiques. Vivant dans l'eau, elle n'a pas besoin de transformer en urée et acide urique, corps moins toxiques que l'ammoniaque, les bases azotées volatiles libérées au cours des échanges, Celles-ci, aussi-

tôt formées, sont éliminées par l'eau de circulation dans le milieu extérieur :

« Tout se passe comme si les êtres aquatiques, dont l'épuration est contante et facile, excrétaient les bases azotées volatiles plus facilement que les animaux qui, peuvent manquer d'eau de circulation dans diverses circonstances. »

En ce qui concerne l'origine de l'ammoniaque, on admet, d'après la théorie classique, qu'elle provient en grande partie de la désamination des acides aminés, soit par oxydation, soit par hydrolyse, suivant les formules schématiques :



Les résultats que nous avons trouvés pour l'excrétion ammoniacale ne permettent pas de fixer la part revenant à ces deux processus, mais, cependant, étant données la baisse de l'excrétion azotée totale pendant l'anaérobiose et surtout l'augmentation contemporaine de l'excrétion des acides aminés, il semble que la désamination soit liée surtout à des processus d'oxydation. En outre, signalons que, bien que nous n'ayons pas enregistré dans l'anaérobiose une baisse de l'ammoniaque aussi accentuée que celle trouvée par Pütter (7 à 8 %), l'excrétion ammoniacale s'est montrée plus faible en anaérobiose que dans le jeûne et l'alimentation.

3° Acides aminés

La Sangsue excrète normalement des acides aminés. Le rapport moyen de N aminé pour 100 d'N total dans les liquides contenant les excréta est de 5,2 % pendant le jeûne. Il varie de 1,6 à 7,3 % pour les Sangsues alimentées. L'excrétion d'azote aminé pouvant être considérée comme une perte pour l'organisme, on voit par ces chiffres que les processus d'utilisation des protéines par la Sangsue sont bons. Rappelons que, dans

l'urine de l'Homme, l'azote aminé forme les 2 centièmes environ de l'excrétion azotée totale.

L'excrétion d'azote aminé est faible dans les premiers jours qui suivent l'alimentation, ce qui indique que la Sangsue s'adapte bien à l'énorme charge alimentaire qu'elle reçoit brusquement.

Au contraire, pendant l'anaérobiose, l'excrétion d'azote aminé s'élève. Nous voyons à ce fait deux explications possibles : 1° la Sangsue, dans l'impossibilité d'oxyder les acides aminés pour les désaminer, « laisse filer » ces acides ; 2° l'anaérobiose provoque peut-être une altération des processus d'excrétion et paralyse le fonctionnement des émonctoires.

4° Créatinine

L'azote excrété sous forme de créatinine est de 13,9 % en moyenne chez les animaux à jeun et varie de 5,2 à 11,4 % chez les animaux en alimentation, d'après nos propres recherches.

Nous n'avons pas constaté la présence de créatine dans les liquides contenant les excréta.

Chez les animaux mis en anaérobiose, l'excrétion est légèrement augmentée en valeur relative (jusqu'à 20 % de l'excrétion azotée totale).

Toutefois, les pourcentages n'ont ici qu'une valeur restreinte, car, en valeur absolue, c'est-à-dire pour 100 gr. d'animaux, l'excrétion de la créatinine est sensiblement constante (2 mgr. 14 à jeun, 2 mgr. 75 à 2 mgr. en digestion, 0 mgr. 61 à 1 mgr. 98 pendant l'anaérobiose).

Ces résultats s'accordent avec les théories les plus récentes sur l'origine et la formation de la créatinine.

D'après Folin, en effet, la créatinine est un constituant urinaire constant qui est éliminé en quantités indépendantes de la nature et de l'abondance des protides ingérés. Elle dépend à la fois du métabolisme endogène et des apports exogènes de créatinine (viande, bouillon).

Pour M. Terroine, M^{lles} Champagne et Mourot [37], les processus générateurs de la créatinine tiennent une très grande place dans le métabolisme endogène. L'excrétion de ce corps serait sous la dépendance simultanée de la dépense énergétique et de la masse musculaire. La formation endogène de la créatinine semble expliquer pourquoi les variations de régime n'ont pas d'influence appréciable sur son excrétion qui demeure constante même *pendant l'anaérobiose*.

CHAPITRE TROISIÈME

EXCRÉTION CARBONÉE

A. — Historique

Contrairement à l'excrétion azotée, les documents se rapportant à l'excrétion carbonée de la Sangsue sont rares. En dehors de ces documents, nous citerons les travaux des auteurs qui ont étudié l'excrétion carbonée d'*Ascaris Lumbricoïdes* et *A. Megalocephala*, estimant que la comparaison de l'excrétion des Oligochètes et des Hirudinées ne manque pas d'intérêt au point de vue biologique.

Voici, tout d'abord, les documents se rapportant à l'excrétion d'acide carbonique, de mucus et de carbone organique soluble chez la Sangsue :

1° ACIDE CARBONIQUE. — Les principales recherches sur ce sujet sont celles de Spallanzani [35], Jolyet et Regnard [21], de A. Pütter [31] et de Bialaszewick [4].

Jolyet et Regnard ont mesuré la quantité de gaz carbonique exhalée et la quantité d'oxygène consommée par 104 Sangsues pesant 235 gr. L'expérience a duré quarante-sept heures à la température de 13°5. La composition de l'eau avant et après l'expérience était sensiblement la même. Voici les résultats obtenus :

Expérience I. — Sangsues à jeun

Volume de l'oxygène consommé	256 cm ³
Volume de l'acide carbonique exhalé	177 "
Rapport entre le volume de l'oxygène consommé et le volume de CO ² exhalé	0,69
Volume de l'oxygène consommé par heure. —	5,4 cm ³
Volume de l'oxygène consommé par heure et par kgr. d'animal	22,98 "
Volume du CO ² exhalé par heure et par kgr. d'animal	16 "

Expérience II. — Sangsues en digestion

Les mêmes Sangsues ont été remises dans l'appareil après s'être gorgées de sang sur un chien (T = 13°). L'expérience a duré quarante-neuf heures.

Volume de O ² consommé	495 cm ³ 4
Volume de CO ² exhalé	457 cm ³ 3
Rapport entre le volume du CO ² exhalé et le volume de l'oxygène consommé ...	0,9
Volume d'oxygène absorbé par heure ...	43 cm ³
Volume du CO ² exhalé par heure et par kgr. d'animal	39 cm ³ 7

Jolyet et Regnard ajoutent :

« On peut voir dans les deux expériences précédentes l'influence de la digestion. Chez les Sangsues gorgées de sang depuis cinq jours, l'absorption d'oxygène dans le même temps a été près de deux fois plus grande ; en même temps, le rapport $\frac{\text{CO}^2}{\text{O}^2}$ s'est élevé de 0,69 à 0,9. »

On voit également que le volume du CO² exhalé par kilo de Sangsues alimentées en une heure représente plus de deux

fois le volume de CO^2 exhalé en une heure par kilo de Sangsues jeun (de 16 cm^3 à 39 cm^3 7).

Pütter a également mesuré la quantité de CO^2 éliminé par des lots de Sangsues au cours de plusieurs expériences : pour un lot qui avait pris de la nourriture trois mois auparavant, pour un poids de 50 à 75 gr., à une température de 17 à 19°, l'excrétion de CO^2 a varié de 86 à 136 mgr. en deux jours, avec une consommation d'oxygène de 132 à 177 mgr. Pour une température inférieure, l'excrétion de CO^2 a été moindre, ainsi que l'absorption d'oxygène. Le quotient respiratoire $\frac{\text{CO}^2}{\text{O}^2}$

six mois après la prise de nourriture, est très faible (0,4 à 0,7). A ce moment, l'intestin de l'animal contient encore beaucoup d'albumine et ce quotient semble dû en grande partie à la décomposition de l'albumine. Loin de l'alimentation, le quotient respiratoire s'élève jusqu'à 1.

Pütter a également étudié le comportement des Sangsues dans une atmosphère privée d'oxygène. Les animaux ont supporté très bien l'anaérobiose pendant vingt-quatre à quarante-huit heures lorsqu'ils étaient à jeun ; lorsqu'ils étaient gorgés de sang, ils ont résisté moins bien.

Relativement au processus du métabolisme, lors de la privation d'oxygène, Pütter a trouvé que :

1° La production de CO^2 s'élève d'une façon extraordinaire, élévation qui atteint son maximum au bout d'environ cinq heures, puis baisse rapidement et devient stationnaire ;

2° Une élévation de température de 18 à 20 degrés rend beaucoup plus rapide cette plus-value de CO^2 qu'une élévation correspondante de température en présence d'oxygène ;

3° La quantité de CO^2 excrétée par rapport au C total ne subit, dans la privation d'oxygène, aucun changement.

Il a conclu qu'il n'existe pas de différence essentielle entre le métabolisme anaérobie et aérobie de la Sangsue.

2° MUCUS. — A. Pütter est, à notre connaissance, le seul

auteur ayant dosé le carbone du mucus provenant de la desquamation de la peau de la Sangsue. Voici ce que rapporte E. Weinland à ce sujet :

« Comme produit d'excrétion, Pütter a trouvé une substance azotée muqueuse provenant de la peau de l'animal... l'excrétion de CO_2 sous forme de mucus a été trouvée par Pütter variant de 9 à 30 mgr. par kg. de substance sèche et par heure, suivant la température. »

3° CARBONE ORGANIQUE SOLUBLE. — Une autre partie du carbone total éliminé par la Sangsue est, d'après Pütter, le carbone excrété sous forme soluble. Pütter l'a déterminé par la différence trouvée entre le carbone de CO_2 et le carbone du mucus soustrait de la perte totale de carbone que les animaux ont faite depuis le début de l'expérience. Il calcule ainsi une grandeur élevée qui atteint jusqu'à la moitié du carbone total excrété. Pütter a aussi signalé l'excrétion fréquente d'acide acétique et a soupçonné l'excrétion d'acide lactique et d'acétone.

Le calcul indirect et peu précis de Pütter est le seul document se rapportant à l'excrétion carbonée soluble. S'il ne fournit aucun chiffre digne d'être retenu, il a du moins le mérite de montrer que l'excrétion carbonée de la Sangsue se fait en partie sous forme soluble et laisse supposer qu'on trouvera en quantité notable dans le liquide où ont vécu les animaux des déchets carbonés provenant du métabolisme.

Les travaux se rapportant à *Ascaris Lumbricoïdes* et *A. Megalocephala* sont assez nombreux (E. Weinland, A. Flury et Anton Fischer).

E. Weinland [41], travaillant sur *Ascaris Lumbricoïdes*, a montré que ces animaux, maintenus à la température du corps (37°) dans une solution de chlorure de sodium à 1 %, excrétaient de notables quantités de corps azotés et des *acides gras volatils*. Ces derniers sont éliminés en quantité suffisante pour donner au liquide une réaction nettement acide ; ils ont leur origine, non dans des processus bactériens, mais dans le

métabolisme même des animaux en expérience. D'après l'analyse des sels de Ca de ces acides, il s'agirait surtout d'*acides valérianique* et *caproïque*. Il semble que ces acides gras soient excrétés par les canaux néphridiens et non par les matières fécales ou par la sécrétion de la peau. 100 gr. d'*Ascaris* non alimentés ont fourni par jour 0 gr. 3 d'*acides gras*. Weinland a toujours employé un grand nombre d'animaux et l'expérience a duré au moins deux jours et souvent jusqu'à six jours.

F. Flury [12] a repris les expériences de Weinland sur *Ascaris Lumbricoides* et *A. Megalocephala*. Il a trouvé beaucoup de sels ammoniacaux et des *acides gras* : *butyrique*, *valérianique* et *caproïque*. Les chiffres d'*acides gras* sont notablement plus élevés que ceux de E. Weinland :

« Après de nombreux dosages quantitatifs, écrit-il (p. 318), 100 gr. d'*Ascaris* alimentés auparavant ont fourni 400 à 850 mgr. d'*acides* par jour calculés en acide valérianique. »

Flury a pu, en outre, démontrer la présence d'acide formique, il a soupçonné la présence d'*aldéhydes*, d'*éthers*, de *mercaptans* et d'*acides aminés*, mais toutes ces substances ont été excrétées en trop faible quantité pour être dosées. En sept jours, c'est-à-dire dans un espace de temps où l'excrétion d'acide valérianique a été au moins de 10 gr., 375 gr. de vers ont excrété seulement 13 mgr. 8 d'acide formique. L'auteur n'a pas trouvé de créatinine, d'urée, d'acide urique et de bases puriques dans le milieu de culture.

Pour Weinland, l'acide valérianique produit *in vivo* au cours du métabolisme des glucides se forme suivant la formule :



Les expériences d'A. Fischer [11] ont eu pour but de contrôler ce dernier fait pour *Ascaris Megalocephala*. Cet auteur est parti de l'idée que ces vers parasites, capables de vivre sans O², devaient se comporter comme le muscle des Vertébrés en anaérobiose, c'est-à-dire transformer le glycogène et les autres glucides en acide lactique. Il a donc recherché l'acide lactique dans un volume déterminé de solution physiologique

de ClNa où avaient vécu des quantités connues d'*Ascaris Megalocephala* provenant de l'intestin de Chevaux. Les vers sont morts en l'espace de vingt heures, même lorsqu'ils ont été placés dans la solution de Ringer additionnée de solution d'hydroxyde de sodium à 1 %. A des intervalles donnés, une quantité aliquote de liquide a été titrée après ébullition avec la phénolphthaléine. Sur une autre prise d'essai, l'acide lactique a été déterminé d'après la méthode de Fürth et Charnass. Dans ces conditions, la quantité d'acide excrétée a diminué progressivement au cours des vingt heures de vie et la majeure partie de l'acidité a été excrétée déjà au cours des premières heures. La quantité d'acide lactique excrétée est faible (10 % au maximum de l'acidité totale), elle ne montre aucune augmentation nette avec le temps.

L'auteur a étudié ensuite la quantité d'acide lactique formé *in vitro* au cours de l'autolyse des animaux totaux préalablement broyés, du muscle et des organes génitaux. Les expériences ont montré que l'acidité maxima est atteinte en cinquante heures environ et qu'elle est en moyenne de 1,70 % calculée en acide lactique. La plus grande partie de l'acide formé n'est pas volatile et s'identifie, lors de la recherche, avec l'acide lactique. Enfin, les organes génitaux ont fourni nettement plus d'acide lactique que les muscles.

L'auteur a conclu de ses recherches que le métabolisme des glucides semble s'effectuer, chez l'*Ascaris Megalocephala*, comme chez les autres animaux, en passant par le stade *acide lactique* et non, comme l'avait soutenu Weinland, en donnant de l'acide valérianique.

De l'ensemble de ces recherches, quelque peu contradictoires, se dégagent cependant quelques indications précieuses qui ont orienté nos recherches vers l'étude des acides organiques présents dans l'eau où avaient vécu des Sangsues.

B. — Recherches personnelles

Nous avons cherché à répondre d'une façon aussi précise que possible aux questions suivantes :

— Quelles sont les quantités de carbone organique soluble éliminées par des Sangsues à jeun, alimentées et en anaérobiose dans des conditions expérimentales connues ?

— Quel est le rapport du carbone total excrété à l'azote total dans les mêmes conditions ?

— Quelle est la nature et l'importance des corps solubles carbonés organiques excrétés, et dans quelle mesure peut-on procéder avec ces données à l'établissement du bilan carboné de la Sangsue ?

A ces études sur le carbone organique soluble, nous avons aussi adjoint quelques recherches sur l'acide carbonique exhalé par des Sangsues alimentées et sur le rapport de cet acide au carbone organique total. Ces recherches sont malheureusement peu nombreuses et n'ont pu être étendues aux Sangsues à jeun. Aussi, nous n'en fournissons les résultats qu'à titre d'indication.

TECHNIQUE

Nous avons dosé le carbone total (C.T.) par fusion alcaline, suivant la microméthode de Nicloux-Lescœur ; les acides organiques totaux (A.O.T.) et leur carbone (C.A.O.), les acides volatils (A.V.) par les méthodes décrites dans la thèse de M. Lafargue, le carbone des substances réductrices probablement glucidiques exprimées en glucose a été déterminé par la méthode de Hagedorn-Jensen après hydrolyse acide (1) ; nous avons déterminé encore par le calcul le carbone lié à l'azote appartenant à la créatinine (C.C.) dosée lors de l'étude des excréta azotés et le carbone des acides aminés dosés par la méthode au formol de H. Delaunay.

Dosage du carbone total

Nous avons utilisé la microméthode de Nicloux-Lescœur en

1. — Pour ces dosages, l'aide et les conseils de M. LAFARGUE, Docteur de l'Université, nous ont été précieux et nous tenons à lui en exprimer ici notre reconnaissance. Deux notes en collaboration avec M. LAFARGUE ont été publiées à la Société de Biologie : 1° Sur l'excrétion carbonée organique de la sangsue à jeun et alimentée. Comptes rendus des séances de la Société de Biologie. Tome CXI, p. 183. 2° Les modifications de l'excrétion carbonée organique de la sangsue sous l'action de la privation d'oxygène. Ibid. p. 185.

suivant point par point la technique par oxydation à l'aide du mélange nitro-alkalin et dosage du carbonate formé en opérant sur le résidu d'évaporation du liquide d'excrétion préalablement débarrassé des phosphates et carbonates par la baryte.

On trouvera la description détaillée de cette méthode dans le mémoire de Nicloux et dans le *Précis de Chimie analytique* de Denigès, Chelle et Labat, t. II, p. 89.

Nous en donnons néanmoins le détail à cause de manipulations particulières nécessitées pour nos recherches :

1° *Cas d'un liquide non protéique.* — C est le cas général, les liquides contenant les excréta de la Sangsue ne renfermant pas normalement d'albumine (réaction de Tanret négative).

a) 50 cm³ ou 100 cm³ de liquide sont versés dans des capsules en Pyrex de 50 cm³, additionnés de quelques gouttes de solution aqueuse d'NH³ à 22° destinée à fixer les acides organiques volatils présents dans le liquide, et évaporés à sec vers 60 ou 70°.

b) Le résidu d'évaporation est repris par le moins possible d'eau distillée (2 ou 3 cm³) qu'on verse ensuite dans un tube à centrifuger. On ajoute 0,5 cm³ d'eau de baryte saturée pour précipiter les phosphates, les carbonates et le mucus s'il s'en trouve.

c) Centrifuger, décanter le liquide clair et le verser dans un tube Pyrex. Laver le précipité par quelques gouttes d'eau distillée bouillie et centrifugée. Les liquides réunis ne doivent pas dépasser au total 4 à 5 cm³.

d) 100 à 150 mgr. d'azotate de potassium et d'azotate de sodium purs et 0 cm³ 5 de NaOH 2N décarbonatée sont ajoutés au liquide. On chauffe le tout à feu nu très doucement pour éviter les projections et en agitant continuellement, afin de briser la mousse qui tend à se former. Le gaz carbonique de l'air ne risque pas, dans ces conditions, de se fixer sur la baryte, car l'ébullition l'en empêche. Après avoir évaporé la presque totalité du liquide, on adapte au tube Pyrex un petit réfrigérant spécial et, après évaporation totale du liquide, on

procède à la fusion alcaline suivant le procédé de Nicloux. (Voir Denigès, t. II, p. 89.)

e) Après refroidissement complet, on verse sur le résidu de fusion l'eau distillée chaude bouillie (2 cm^3), puis 2 cm^3 de solution également chaude de chlorure de baryum à 10 %. Après avoir bien mélangé avec un agitateur pour favoriser la formation du précipité de CO^3Ba , on lave l'agitateur avec un jet de pissette. Lorsque le CO^3Ba tend à monter le long du tube, on ajoute quelques gouttes d'alcool. Centrifuger rapidement (40 à 45 secondes) et décanter le liquide par renversement. Remettre le précipité en suspension dans de l'eau distillée bouillie, centrifuger et décanter. Le lavage est répété trois fois.

f) Le précipité de CO^3Ba étant bien purifié, on procède au titrage de CO^2 . Sur le précipité, on verse 10 cm^3 de $\text{HCl } \frac{\text{N}}{20}$ coloré au rouge de méthyle, selon la méthode de Pregl, pour dissoudre le CO^3Ba qui est mis en suspension par un agitateur. Le liquide doit rester rouge. Il est transvasé aussitôt dans un petit Erlenmeyer de 75 cm^3 . On lave le tube Pyrex plusieurs fois à l'eau distillée bouillie que l'on ajoute à la solution chlorhydrique et l'on fait bouillir le tout, afin de chasser le CO^2 qui augmenterait l'acidité du liquide et provoquerait une erreur par excès. On titre enfin avec la solution de $\text{HO Na } \frac{\text{N}}{20}$ de Pregl jusqu'à coloration jaune.

Soit $\text{N} = \text{cm}^3$ d' $\text{HO Na } \frac{\text{N}}{20}$ correspondant à 10 cm^3 d' $\text{HCl } \frac{\text{N}}{20}$
 $n = \text{cm}^3$ d' $\text{HO Na } \frac{\text{N}}{20}$ nécessaires pour neutraliser l'excès
d' $\text{H Cl } \frac{\text{N}}{20}$ du liquide.

La quantité de carbone, en milligrammes, contenue dans la prise d'essai sera :

$(\text{N} - n) - 0,20 \times 0,3 = \text{C}$ en milligrammes pour 50 ou 100 cm^3 suivant la prise d'essai. (0,20 correspond à l'erreur due aux réactifs, déterminée par une opération à blanc et que l'on retranche chaque fois de la valeur trouvée dans l'essai.)

2° *Cas d'un liquide protéique.* — Une modification du dosage est nécessaire lorsque les liquides d'excrétion contiennent de l'albumine (R. de Tanret positive). Dans ce cas, le résidu sec, provenant de l'évaporation de 50 ou 100 cm³ de liquide, est repris dans la capsule par 0 cm³ 5 d'une solution de tungstate de soude à 10 % ; ajouter ensuite 0 cm³ 5 d'SO⁴H², 2/3 N, agiter pendant quelques instants et verser le tout dans un tube à centrifuger avec les quelques gouttes d'eau distillée qui ont servi à rincer la capsule. On ajoute à ce liquide, en agitant, de la solution saturée de Ba (OH)² en quantité suffisante pour précipiter les phosphates, les carbonates et l'excès de tungstate de soude et d'acide sulfurique. On laisse tomber à la surface du liquide quelques gouttes d'éther pour empêcher la carbonatation par le CO² de l'air et on centrifuge. Le liquide clair est versé dans un tube Pyrex avec un peu d'éther. Le culot de centrifugation est lavé deux fois et les divers liquides sont réunis. On poursuit alors les opérations comme précédemment.

Dosage des acides organiques totaux

Nous avons utilisé la méthode par extraction à l'éther de M. Lafargue. (Thèse, p. 27.)

Les acides organiques combinés ont été rendus libres par addition au liquide, préalablement saturé avec du sulfate d'ammoniaque, d'acide sulfurique en quantité suffisante pour abaisser le pH à 2,5 environ ; leur extraction, en même temps que celle de ceux qui étaient déjà libres, a été effectuée à l'aide de l'éther à 70° pendant une heure et demie dans un appareil analogue à celui qui a été utilisé par Clausen pour doser l'acide lactique dans le sang. Le titrage acidimétrique a été fait à pH 8,3 avec le rouge de crésol comme indicateur par de l'hydroxyde de Na $\frac{N}{50}$. J'ai opéré sur le résidu d'évaporation de 100, 150 ou 200 cm³ de liquide d'excrétion additionnés de quelques gouttes d'N H³ à 22°, évaporés à 60-70° et repris par 2 cm³ d'eau distillée.

La méthode a subi la modification suivante dans le cas d'un

liquide contenant des protéines : le résidu d'évaporation de 100 ou 200 cm³ de liquide (suivant le cas) est repris successivement par 0 cm³ 5 de solution de tungstate de sodium à 10 % et 0 cm³ 5 d'acide sulfurique 2/3 N, liquide que l'on verse ensuite dans un tube à centrifuger avec quelques gouttes d'eau ayant servi à rincer les capsules. On centrifuge et on verse le liquide clair dans le tube à extraction E de l'appareil, on lave deux fois le culot de centrifugation avec quelques gouttes d'eau que l'on joint au liquide primitif. On ajoute 1 gr. 20 environ de sulfate d'ammoniaque pur, six gouttes d'acide sulfurique concentré pur et on procède à l'extraction. Les résultats ont été exprimés en centimètres cubes d'acide N/100 pour 1.000 cm³ pendant quarante-huit heures.

Dosage du carbone des acides organiques

Lors de l'extraction des acides organiques à l'aide de l'éther en vue de leur dosage acidimétrique, on obtient un extrait éthéré contenant les acides organiques totaux (fixes et volatils). Il est inutile, pour doser leur carbone, de les séparer au préalable des phénols libres, des matières extractives et des pigments, comme l'a fait Lafargue pour le dosage du carbone des acides organiques de l'urine humaine. Les liquides d'excrétion des Sangsues, limpides et incolores, ne contiennent, en effet, ces corps qu'en quantités négligeables et peuvent servir directement à l'extraction par l'éther des acides organiques.

Nous renvoyons, pour cette extraction et pour le dosage du carbone des acides, à la thèse déjà citée (p. 74).

Quand les liquides d'excrétion contiennent des protides, la mise en œuvre du dosage est la même que pour le dosage des acides organiques totaux dans un liquide albumineux. On désalbumine à l'acide tungstique, on centrifuge, on lave le culot de centrifugation plusieurs fois, on réunit les liquides dans le tube à extraction E de l'appareil et on procède à l'extraction par l'éther.

L'extraction a porté sur le résidu d'évaporation de 150 à 200 cm³ de liquide primitif préalablement additionné de quel-

ques gouttes d' NH_3 , à 22° , pour fixer les acides organiques volatils pendant la concentration à $60-70^\circ$. Le résidu a été repris par 2 cm^3 environ d'eau distillée bouillie.

Le dosage du carbone des acides organiques a été fait comme pour le carbone total organique en ayant soin d'opérer le dosage sur des prises ne renfermant pas plus de 3 mgr. de carbone. Les calculs sont les mêmes que pour le carbone total. Le chiffre donné dans les tableaux représente le carbone total des acides organiques pour 1.000 cm^3 de liquide d'excrétion pendant quarante-huit heures.

Dosage des acides organiques volatils

Nous avons également eu recours pour ce dosage à la technique décrite par M. Lafargue (thèse, p. 58), dont voici le principe : les acides volatils de l'urine ont été déplacés par l'acide tartrique à pH 3 environ, séparés par distillation dans le vide à une température ne dépassant pas 45° , recueillis dans une petite quantité connue de solution alcaline (5 cm^3 de NaOH N/50, plus quatre à cinq gouttes de phtaléine du phénol) et dosés par titrage en retour de l'excès de cette dernière par SO_4H^2 N/100, jusqu'à décoloration. La prise d'essai a été le résidu d'évaporation de 200 ou 250 cm^3 de liquide préalablement alcalinisé par quelques gouttes de solution aqueuse d'ammoniaque avant son évaporation à $50-60^\circ$, résidu qui a été repris par de l'eau distillée (jusqu'à 20 cm^3).

Les résultats ont été exprimés, comme pour les acides organiques totaux, en centimètres cubes d'acide N/100 pour 1.000 cm^3 en quarante-huit heures.

Dosage du carbone de corps réducteurs de nature glucidique

Pour ce dosage, nous avons employé la microméthode de Hagedorn et Jensen à cause de sa sensibilité très grande, de la simplicité des manipulations et des résultats très satisfaisants qu'elle fournit. Nous avons opéré de la façon suivante : les corps glucidiques se trouvant dans les liquides contenant les

excréta pouvant être des polyholosides, le liquide a été hydrolysé, aussitôt après concentration, à 100° en présence d'acide chlorhydrique. Le pouvoir réducteur des corps glucidiques a été ensuite dosé au ferricyanure de K sans défécation préalable.

Les réactifs nécessaires sont : 1° solution d'acide chlorhydrique N ; 2° solution d'hydroxyde de sodium N ; 3° solution de ferricyanure de K à 1 gr. 65 pour 1.000 alcalinisés par du carbonate de Na (10 gr. 6) ; 4° iodure de potassium pur ; 5° solution de sulfate de zinc et de chlorure de Na préparée en dissolvant 10 gr. SO_4Zn et 50 gr. NaCl dans 200 cm^3 d'eau distillée ; 6° solution d'acide acétique à 3 % ; 7° solution N/10 de thiosulfate de sodium qui sera dilué à N/200 au moment de l'emploi ; 8° empois d'amidon préparé en dissolvant 1 gr. d'amidon soluble dans 100 cm^3 d'une solution saturée bouillante de chlorure de sodium.

Les réactifs doivent être très purs.

Pour l'*hydrolyse acide* : on prélève 50 cm^3 de liquide d'excrétion qui sont évaporés à sec sans précaution spéciale, les glucides fixes n'étant pas décomposés à la température du bain d'eau chaude ($50-70^{\circ}$), le résidu d'évaporation a été repris par 3 cm^3 d'acide chlorhydrique normal. Ce liquide a été centrifugé et le liquide clair versé dans un tube en Pyrex avec 1 cm^3 d'eau distillée ayant servi à laver le culot de centrifugation. L'hydrolyse est effectuée par chauffage au bain-marie bouillant pendant une heure. L'acidité a été alors neutralisée exactement par une solution N d'hydroxyde de sodium par le procédé à la touche.

Le dosage des glucides réducteurs a été effectué directement, sans défécation préalable, de la façon suivante : la prise d'essai, placée dans un gros tube Pyrex, a été additionnée de 2 cm^3 exactement mesurés, à l'aide d'une pipette spéciale soigneusement calibrée et réservée à cet usage, de la solution titrée alcaline de ferricyanure de potassium et portée au bain-marie bouillant pendant un quart d'heure. Après refroidissement

complet, on ajoute 3 cm³ de la solution chlorurée zincique dans laquelle on a fait dissoudre 0 gr. 5 de KI pour 20 cm³ et pour revenir en milieu acide 2 cm³ d'une solution à 3 % d'acide acétique cristallisable. On titre à la goutte l'iode en excès par une solution N/200 de thiosulfate de sodium contenu dans une micro-burette de 2 cm³ et préparée ex-temporaneamente à partir d'une solution-stock N/10 dont la conservation a été vérifiée en présence de deux gouttes de la solution d'amidon. Une épreuve témoin exécutée simultanément, dans laquelle de l'eau distillée remplace le liquide d'excrétion, donnera le chiffre de base. A l'aide de la table de Hagedorn-Jensen, en faisant la correction d'après l'épreuve témoin, on obtient, exprimée en milligrammes de glucose, la quantité de corps réducteurs présents dans la prise d'essai.

Le chiffre de glucose obtenu a été rapporté au litre et le carbone qu'il représente calculé en multipliant le poids du glucose par 0,4. Il y a, en effet, 72 gr. de carbone pour 180 gr. de glucose, soit 0 gr. 4 pour 1 gr.

Nous n'ignorons pas ce qu'a d'arbitraire un dosage de corps réducteurs dont on exprime le résultat en glucose. Nous l'avons fait faute de mieux, étant dans l'impossibilité de tenter l'identification particulièrement délicate de la nature des substances réductrices et ne désirant avoir, d'autre part, qu'une valeur représentative approchée du bloc des substances du type glucidique.

Carbone lié à l'azote

Il a été déterminé au cours de nos recherches et entre dans le bilan de la répartition des corps carbonés et excrétés ; il appartient au carbone de la créatinine et au carbone des acides aminés. Le dosage de ces corps ayant été exposé dans le chapitre « *Excrétion azotée* », il nous suffira de dire que le carbone de la créatinine a été calculé en multipliant par le coefficient 0,424 le poids de la créatinine et que le carbone des acides aminés a été calculé comme carbone du glycolle, le coefficient étant, dans ces conditions, égal à 1,71 (N. aminé $\times$ 1,71).

RÉSULTATS OBTENUS

Données expérimentales. — I. Le carbone total, le carbone des acides organiques, de la créatinine, et des glucides

Pour plus de commodité, nous rappellerons ici le poids des divers lots de Sangsues qui ont été utilisés pour rechercher et doser le carbone organique. Les résultats ont été rapportés à 100 gr. de Sangsues vivant dans 1.000 cm³ d'eau distillée pendant quarante-huit heures. Ils expriment donc à la fois les concentrations par litre et l'excrétion absolue en quarante-huit heures :

Sangsues à jeun :

Lot n° 3 : 15 Sangsues, poids 23 gr. 45

Sangsues alimentées :

Lot n° 3 : 15 Sangsues, poids 115 gr. 57

Poids après un mois. 86 gr. »

Lot n° 4 : 15 Sangsues, poids 113 gr. 29

Poids après un mois. 63 gr. 70

Sangsues en anaérobiose :

Lot n° 1 : 12 Sangsues, poids 24 gr. 52

alimentées depuis 67 jours.

Lot n° 2 : 14 Sangsues, poids 55 gr. 99

alimentées depuis 46 jours.

I. — *Sangsues à jeun*

Durée et dates des analyses		48 h. 5 juin	48 h. 7 juin	48 h. 9 juin	48 h. 13 juin	48 h. 15 juin
pH		7,5	7,3	7,3	7,2	7,1
En mgr. pour 1.000 cm ³ et 48 h.	C.T.	28,14	10,74	28,14	19,18	19,18
	C.A.O.	15,35	5,91	14,07	10,02	12,15
	C.G.	2,96	1,34	1,79	1,25	2,25
	C.C.	2,89	1,62	3,09	2,60	2,09
	C.A.A.	2,35	1,08	2,16	2,16	1,08
Rapports à 100 C.T.	C.A.A.	8,3	10,0	7,6	11,05	5,4
	C.A.O.	54,5	55,05	50,0	52,2	63,3
	C.G.	10,1	11,8	9,1	8,2	11,7
	C.C.	10,2	15,1	10,9	11,9	10,8
	C. dosé	83,1	91,95	77,6	83,8	91,2
	C. indosé	16,9	8,05	23,4	16,2	8,8

L'examen de ce tableau montre que :

1° L'excrétion carbonée organique de la Sangsue est relativement importante, elle varie pour 100 gr. en quarante-huit heures de 10 mgr. (minimum) à 28 mgr. (maximum) ; ces chiffres forts sont peut-être en rapport avec l'élévation de la température du laboratoire qui a varié pendant la période des analyses de 15 à 23° (15 juin). D'après Pütter, en effet, le métabolisme de la Sangsue augmente pour une élévation de température de 12 à 20°.

2° La Sangsue excrète des acides organiques. Le carbone dû à ces acides constitue — comme Weinland et Flury l'ont entrevu pour les *Ascaris* — une part importante du carbone organique total. Le pourcentage du carbone des acides organiques au carbone total est remarquablement fixe (50 à 63 %). Les changements de température ne paraissent donc pas modifier sensiblement l'excrétion des acides organiques par rapport au carbone total. Enfin, si l'on admet avec Pütter que le métabolisme de la Sangsue est surtout un métabolisme proli-

dique, il est probable que les acides organiques proviennent, pour la plus grande part, des échanges azotés.

3° La Sangsue excrète normalement des corps réducteurs de nature glucidique. Le carbone de ces corps, exprimé en carbone du glucose, varie de 8 à 22 % du carbone total. Les écarts de ces chiffres sont-ils dus à l'élévation de température que nous signalons ? De nouvelles expériences sont nécessaires pour être fixé sur ce point.

4° Le carbone excrété sous forme de créatinine est fixe, il représente de 10 à 15 % du carbone total. Nous avons vu plus haut (p. 57) que ce fait est d'accord avec les recherches de Terroine et M^{lles} Champagne et Mouret [39] qui ont fait dépendre l'excrétion de la créatinine de la dépense énergétique et de la masse musculaire, facteurs sensiblement constants chez les Sangsues à l'état de jeûne.

5° Le carbone des acides aminés forme 5 à 11 % du carbone total. Son excrétion est, elle aussi, relativement fixe et semble varier en sens inverse de celle des acides organiques, suivant que la désamination des acides aminés se fait plus ou moins bien.

6° Nous n'avons pu doser qu'une partie du carbone organique soluble. Le carbone indéterminé a varié de 8 à 26 % en période de jeûne. Nous chercherons plus loin à diminuer cet indosé en calculant le carbone provenant de l'urée, des acides aminés et des bases puriques.

II. — Sangsues alimentées

Lots N°		III					IV			
Périodes de 48 h. après l'alimentation		48 h. (1 ^{re})	48 h. (2 ^e)	48 h. (3 ^e)	48 h. (7 ^e)	48 h. (10 ^e)	48 h. (1 ^{re})	48 h. (2 ^e)	48 h. (7 ^e)	48 (8 ^e)
p. H. . . .		7,5	7,1	7,05	7,3	7,5	7,1	7,0	7,5	7,6
En mgr. pour 100 gr.	C. T.	68,2	45,0	45,17	45,5	34,2	46,7	35,3	29,3	31,08
	C. A. O.	24,42	15,12	10,0	19,42	14,82	19,56	13,18	8,32	11,76
	C. G.	3,81	1,89	—	—	2,0	2,17	—	1,49	2,66
	C. C.	3,14	2,57	4,02	2,33	2,73	3,68	1,97	2,52	1,76
	C. A. A.	3,59	2,73	3,59	2,73	1,53	3,31	2,13	3,47	2,13
Rapports à 100 C. T.	C. A. A.	5,2	6,0	7,9	6,0	4,4	7,09	6,03	11,8	7,0
	C. A. O.	35,8	33,6	21,8	42,7	45,3	41,9	57	28,4	36,2
	C. G.	5,6	4,22	—	—	5,83	4,83	—	5,09	6,4
	C. C.	4,6	5,7	8,8	5,1	7,9	7,9	5,6	8,5	5,3
	C. dosé	51,2	49,52	38,5	53,8	63,1	61,72	48,63	53,8	54,9
	C. indosé	48,8	50,48	61,5	46,2	36,9	38,28	51,37	46,2	45,1

L'examen de ce tableau montre :

1° Que la forte élévation des combustions organiques consécutives à l'ingestion de sang déjà signalée par plusieurs auteurs s'accompagne d'une excrétion beaucoup plus élevée de carbone organique soluble (minimum 29 mgr., maximum 68 mgr.). On constate, en effet, que l'excrétion est maxima dans les quarante-huit heures qui suivent l'alimentation, puis baisse jusqu'à une valeur assez constante dans les analyses suivantes.

2° Comme chez la Sangsue à jeun, une quantité importante de carbone est excrétée sous forme d'acides organiques, le pourcentage de ceux-ci est cependant moins élevé qu'à jeun et moins fixe (22 à 45 %).

3° Le carbone excrété sous forme de corps réducteurs varie entre 4 et 6 % du carbone total durant la digestion. Son excrétion est donc assez fixe, elle correspond sans doute à la

perte normale en glucides par la Sangsue. Nous n'avons pas à enregistrer de changement brusque de température pendant les périodes d'analyses, de sorte que nous n'avons pas ici à supposer une influence de cette température sur l'excrétion des corps glucidiques.

4° Le pourcentage du carbone de la créatinine comme celui du carbone des glucides est plus faible pendant la digestion que pendant le jeûne. Il varie entre 5 et 9 % du carbone total. Ce pourcentage ne permet aucune conclusion quant à la quantité absolue de créatinine excrétée. En fait, l'excrétion reste fixe en valeur absolue ou même un peu plus élevée qu'à jeun (2 à 5 mgr. pour les Sangsues alimentées et 2 à 3 mgr. pour les animaux à jeun).

5° Le carbone dû aux acides aminés excrétés semble être moins important après l'alimentation que pendant le jeûne. Il varie entre 4 et 11 % du carbone total, prouvant peut-être ainsi qu'après l'alimentation les échanges sont plus actifs et que la désamination est plus parfaite.

6° Enfin, nous n'avons pu doser qu'une partie du carbone organique soluble. Le carbone indéterminé est, au début de la digestion, le plus élevé (36-61 %), il diminue ensuite (41 % après vingt jours). Cette élévation, venant immédiatement après l'alimentation, semble montrer l'existence d'une dyscarbonurie dont il est difficile de fixer le mécanisme. Nous étudierons plus loin la part qui peut être réservée à ce carbone indosé par suite de l'excrétion des corps telle que l'urée ingérés avec le sang.

III. — *Sangsues en anaérobiose*

Lots n ^{os}		I	II	I		
Durées et dates des analyses		48 h. 9 juin	24 h. 21 juin	24 h. 21 juin	24 h. 23 juin	48 h. (1) 25 juin
pH		5,9	5,5	5,6	5,5	7,1
En mgr. pour 100 gr.	C.T.	81,79	35,91	51,56	73,66	48,42
	C.A.O.	64,56	24,7	47,76	58,94	37,89
	C.G.	3,705	0,270	2,33	1,72	3,05
	C.C.	5,38	2,27	1,402	0,73	2,15
Rapports à 100 C.T.	C.A.A.	7,19	0,68	1,36	0,97	3,43
	C.A.A.	8,8	1,8	2,6	1,3	7,0
	C.A.O.	78,9	68,1	84,6	80,2	78,2
	C.G.	4,53	3,01	4,14	2,35	6,31
	C.C.	6,5	6,32	7,5	1,0	4,45
	C. dosé	98,73	79,23	98,84	84,85	95,96
	C. indosé	1,27	20,77	1,16	15,15	4,04

De l'examen de ce tableau, il ressort que :

1° La privation d'oxygène a eu pour conséquence d'augmenter beaucoup la réaction ionique des liquides dans lesquels ont vécu les animaux. Le pH des liquides s'est abaissé, en effet, à 5,5 environ après quarante-huit heures d'anaérobiose, alors qu'il oscille autour de 7,5 à l'état normal. Nous avons déjà admis dans le chapitre premier (Excrétion minérale) que ce fait est dû la fois à l'augmentation considérable de l'excrétion d'acides organiques et à l'abaissement simultané de l'excrétion ammoniacale ; nous en donnons maintenant la démonstration, puisque l'augmentation de l'excrétion des acides organiques totaux atteint plus de quatre fois l'excrétion moyenne de ces acides pour les Sangsues vivant normalement.

2° L'excrétion du carbone organique total est aussi très élevée et ses valeurs dépassent celles enregistrées pendant l'ali-

mentation. Ce fait est dû, en grande partie, à la forte augmentation de l'excrétion d'acides organiques qui n'ont pu être comburés par suite du manque d'oxygène. Le rapport C/N, que nous étudierons plus loin, met aussi en valeur cette perturbation des échanges. Alors qu'il est normalement voisin de 1 chez les animaux à jeun, il s'élève ici jusqu'à 10,3.

3° Le carbone réducteur est légèrement diminué en valeur relative ; son excrétion semble beaucoup plus constante que celle du carbone des acides organiques.

4° Le carbone de la créatinine est légèrement diminué en valeur relative, mais reste cependant remarquablement fixe en valeur absolue (2 mgr. à 5 mgr.).

5° Le carbone indéterminé ne donne lieu à aucune considération spéciale. Il varie de 4 à 22 %.

6° L'excrétion d'acides aminés paraît faible et le carbone dû à ces acides forme seulement 1 à 2 % du carbone total excrété (exceptionnellement 8 %). Ce fait est en rapport avec ce que nous avons déjà remarqué dans l'anaérobiose à propos de l'excrétion azotée : ralentissement très marqué de l'excrétion ammoniacale et de l'excrétion azotée tout entière.

7° Les troubles de l'excrétion du carbone organique consécutifs à la privation d'oxygène disparaissent rapidement lorsque les animaux sont remis en vie normale, ainsi que le montre la dernière colonne du tableau. Le pH remonte à 7,1, l'excrétion du carbone total s'abaisse à 48 mgr. pour quarante-huit heures, tandis que le carbone glucidique et la créatinine reprennent les valeurs enregistrées pendant le jeûne et l'alimentation.

Il nous reste maintenant, en présence de ces résultats, à essayer d'établir pour les Sangsues à jeun, alimentées et en anaérobiose, un bilan de la répartition du carbone comparable à celui qui a été établi déjà pour l'urine des Vertébrés.

II. — Essai sur la répartition du carbone organique

Nous avons essayé d'établir la répartition du carbone organique soluble excrété par la Sangsue, afin de nous rendre mieux compte de l'importance relative des matériaux excrétés.

Il existe plusieurs catégories de composés organiques carbonés :

1° Des composés azotés comprenant principalement l'urée, la créatinine, les acides aminés et les bases puriques ;

2° Des composés ternaires, les acides organiques et les corps de nature glucidique ayant échappé à l'oxydation ;

3° Des substances carbonées encore indéterminées.

Comme nous n'avons pas dosé nous-mêmes l'urée et les bases puriques, nous nous sommes reportés, pour calculer leur carbone, aux pourcentages établis par H. Delaunay (thèse, p. 31).

L'urée forme environ les 3,8 centièmes de l'azote total chez les Sangsues à jeun, elle varie entre 10 et 4 % de l'azote total chez les Sangsues alimentées.

L'azote purique forme les 4,35 centièmes de l'azote total chez les Sangsues à jeun et varie entre 3,8 et 2 % chez les Sangsues alimentées.

Nous n'avons pas de valeurs pour les Sangsues en anaérobiose. Nous avons calculé le carbone appartenant aux acides aminés en convenant de considérer tout l'azote aminé sous forme de glycocolle, ce qui conduit à multiplier l'azote aminé par 1,71 ; le carbone de l'urée a été obtenu en utilisant le coefficient de 0,428 par rapport à l'azote ; celui de la créatinine, le coefficient 0,424 par rapport au poids de créatinine exprimé en grammes. Quant à celui des bases puriques (adénine, guanine, hypoxanthine et xanthine), nous l'avons calculé en multipliant leur azote par le coefficient 0,86.

La somme de ce carbone constitue le « carbone lié à l'azote » et la différence entre le carbone total et sa valeur le « carbone non lié à l'azote » ou carbone ternaire.

Nous avons négligé dans nos calculs de tenir compte de l'azote fourni par les acides organiques : ceux-ci sont, en effet, formés en majeure partie d'acides volatils et leur teneur en azote est négligeable.

	SANGSUES			
	à jeun	alimentées		en anaéro- biose
	2 ^e jour	20 ^e jour		
En milligrammes par litre :				
Carbone total	28,14	68,2	34,2	147,32
Azote total	30,70	52,5	28,9	14,2
Rapport $\frac{C}{N}$	0,91	1,3	1,18	10,3
Carbone de l'urée	0,49	2,24	0,83	—
Carbone de créatininé	2,89	3,14	2,73	1,46
Carbone des acides aminés..	2,35	3,59	1,53	0,51
Carbone des bases puriques	1,14	1,71	0,90	—
Carbone lié à l'azote	6,38	11,68	5,99	1,97
Pourcentages :				
$\frac{\text{Carbone lié à l'azote}}{\text{Azote total}}$	20,8	22,2	20,7	13,8
$\frac{\text{Carbone lié à l'azote}}{\text{Carbone total}}$	23,0	17,1	17,5	0,13
En milligrammes par litre :				
Carbone non lié à l'azote..	21,76	56,52	28,21	145,35
Carb. des acides organiques	15,35	24,42	14,82	117,88
Carbone des glucides	2,96	3,81	2,0	3,44
Pourcentages :				
$\frac{C. \text{ des acides organiques}}{C. \text{ total}}$	54,5	35,8	45,3	80,2
$\frac{C. \text{ des acides organiques}}{C. \text{ non lié à N}}$	70,5	44,4	52,5	80,7
Rapport $\frac{C}{N}$ des corps dosés.	3,1	2,9	3,6	52,2
Carbone dosé sur 100 de C.T.	89,4	58,6	66,6	83,8
Carbone non dosé sur 100 de C.T.	10,6	41,4	33,4	16,2

Les chiffres obtenus montrent que :

1° Le carbone lié à l'azote représente de 17 à 23 % du carbone total à l'état normal et est sensiblement fixe (20,7 à 22,2 %) par rapport à l'azote total. L'excrétion d'urée, de créatinine, de bases puriques et d'acides aminés semble, en

effet, être constante comme l'excrétion ammoniacale, de telle sorte que les divers rapports de ces corps avec l'azote total varient peu.

2° Le carbone des acides organiques est relativement moins élevé pendant l'alimentation que pendant le jeûne. Il semble cependant que, dès le vingtième jour après l'alimentation, ces valeurs tendent à se rapprocher de celles enregistrées pendant le jeûne.

3° Le carbone dosé atteint 89,4 % pendant le jeûne. Il est moins élevé pendant l'alimentation, le pourcentage étant seulement de 58,6 à 66,6 dans nos expériences. Ceci est dû sans doute à l'excrétion d'un carbone neutre indéterminé probablement de nature ternaïre.

4° L'anaérobiose provoque des perturbations énormes dans l'excrétion carbonée : le rapport C/N s'élève à 10,3 ; le carbone lié à l'azote (celui de l'urée et des bases puriques n'y est pas compris, car nous n'avons aucune donnée expérimentale sur sa valeur) forme alors seulement 0,13 du carbone total ; l'excrétion carbonée se fait, pour la majeure partie, sous forme d'acides organiques, cette excrétion étant elle-même considérablement augmentée (117 mgr. 88 contre 15 mgr. 35) et formant les 80 centièmes de l'excrétion carbonée totale. L'excrétion de carbone indéterminé neutre est peu élevée et se rapproche de celle du jeûne.

III. — Les acides organiques

Nous avons déjà vu que les travaux de E. Weinland, A. Flury et Anton Fischer sur *Ascaris Lumbricoïdes* et *A. Megalocephala* ont montré que ces Vers excrétaient beaucoup d'acides gras volatils : butyrique, valérianique et caproïque. F. Flury a pu, en outre, démontrer la présence d'acide formique et A. Fischer celle d'acide lactique.

Nous avons été ainsi conduits à préciser la nature et l'importance des acides organiques excrétés par la Sangsue. Pour

différencier les divers acides qui forment le bloc des acides organiques totaux, nous avons tout d'abord séparé les acides organiques volatils de ceux qui sont fixes. Les acides volatils constituent, comme on sait, les premiers termes de la série aliphatique et s'arrêtent après le terme C^5 ; ce sont les acides formique, acétique, propionique, butyrique et iso, valérianique et iso.

Voici les résultats obtenus. L'acidité totale et volatile est calculée en cm^3 d'acide N/100 pour 100 gr. de Sangsues vivant dans 1.000 cm^3 d'eau distillée pendant quarante-huit heures.

Sangsues à jeun : Lot n° III

Dates et durée des analyses	48 h. 5 juin	48 h. 7 juin	48 h. 9 juin	48 h. 13 juin	48 h. 15 juin
pH	7,5	7,3	7,3	7,2	7,1
en cm^3 $\frac{N}{100}$ { A.V.	15,88	10,12	14,39	12,79	16,52
pour 100 gr. { A.O.T.	22,34	12,25	19,72	15,99	17,59
Pourcentage $\frac{A.V.}{A.O.T.}$	69,0	82,6	73,0	80,0	93,8

Sangues alimentées : Lots n^{os} III et IV

Lots N ^o		III					IV			
Périodes de 48 h. après l'alimentation		48 h. (1 ^{re})	48 h. (2 ^e)	48 h. (3 ^e)	48 h. (7 ^e)	48 h. (10 ^e)	48 h. (1 ^{re})	48 h. (2 ^e)	48 h. (7 ^e)	48 h. (8 ^e)
pH		7,5	7,1	7,05	7,3	7,5	7,1	7,0	7,5	7,6
en cm ³ N 100 p. 100 gr.	A. V.	17,5	20,35	15,0	13,83	16,07	14,75	14,75	12,55	15,69
	A. O. T.	21,78	28,92	16,42	25,44	23,21	18,21	20,08	24,06	26,68
Pourcentage	A. V.	80,0	70,0	93,0	54,0	60,0	81,0	73,0	52,3	58,8
	A. O. T.									

Sangues en anaérobiose : Lots n^{os} I et II

Lots n ^{os}		I	II	I		
Durées et dates des analyses		48 h. 9 juin	24 h. 21 juin	24 h. 21 juin	24 h. 23 juin	48 h. (1) 25 juin
—		—	—	—	—	—
pH		5,9	5,5	5,6	5,5	7,1
en cm ³ N 100	A.V.	123,5	31,5	96,05	114,47	34,03
	A.O.T.	127,9	39,5	97,36	119,98	49,12
pour 100 gr.						
A.V.						
Pourcentage		96,5	79,1	98,6	95,6	70,00
A.O.T.						

De l'examen de ces tableaux, il se dégage ce fait intéressant que les acides organiques sont représentés en majorité par des acides volatils : 82 % en moyenne pendant le jeûne, le

(1) Vie aérobie.

pourcentage décroissant graduellement pendant la digestion (80 à 60 %). Pendant l'anaérobiose, ces acides gras arrivent à constituer plus de 98 % de l'acidité organique totale.

Remises en vie normale depuis quarante-huit heures, les Sangsues éliminent moins d'acides gras volatils et le pourcentage de ceux-ci tombe à 70 %.

Cette forte excrétion d'acides volatils nous a conduit à tenter de déterminer quelques-uns d'entre eux.

En dosant l'acidité volatile éliminée en vingt-quatre heures par le lot n° I des Sangsues mises en anaérobiose, nous avons été frappés par le fait suivant :

Le 21 juin, le rapport de l'acidité volatile à l'acidité organique totale est 98,6 % et le carbone de ces acides organiques totaux est de 18 mgr. 15.

Le 23 juin, le rapport précédent est de 95,6 et il y a 22 mgr. 4 de carbone dans les acides organiques totaux.

Si nous calculons en acide butyrique (C^4) le carbone dû aux acides volatils, nous trouvons : le 21 juin, carbone des acides volatils calculé en acide butyrique, 17 mgr. 52, soit 96,7 % du carbone des acides organiques totaux.

Le 23 juin, le carbone des acides volatils calculés en acide butyrique : 20 mgr. 88, soit 93,2 % du carbone des acides organiques.

Théoriquement, il semble donc que les acides organiques éliminés aient été constitués presque uniquement par de l'acide butyrique ou par un mélange d'acides gras (par exemple, d'une part, butyrique (C^4), d'autre part, valériannique (C^5) et propionique (C^3) constitués par autant de carbone que l'acide butyrique seul.

Nous avons aussitôt cherché à caractériser l'acide butyrique dans un liquide d'excrétion de Sangsues mises en anaérobiose. Voici comment nous avons procédé :

Le liquide de titration des acides volatils (voir ci-dessus) contient ceux-ci sous forme de sels de Na avec en plus un peu de sulfate de sodium et de la phénolphthaleïne, qui a servi comme indicateur.

Il est possible de caractériser l'acide butyrique dans ce liquide à l'aide du procédé dû à G. Denigès [9], qui comprend l'oxydation de l'acide butyrique en acide diacétique à l'aide de l'eau oxygénée en présence de sulfate ferreux employé comme catalyseur et la caractérisation de l'acide diacétique formé au moyen de la réaction de Legal, modifiée par Imbert. Dans ce but, on met dans un fort tube à essai 10 cm³ du liquide dans lequel on veut caractériser l'acide butyrique, 0 cm³ 3 d'eau oxygénée à un volume et 1 cm³ d'une solution faite avec 5 gr. de sulfate de fer ammoniacal, 10 cm³ d'acide sulfurique au 1/10 en volume et une quantité d'eau distillée suffisante pour obtenir 100 cm³ de solution.

On porte le tube à essais cinq minutes au bain d'eau à 68-70°. On retire de l'eau et on ajoute 6 gouttes de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. On refroidit complètement et on filtre pour éliminer l'hydrate de fer formé. Sur ce liquide, nous avons caractérisé l'acide diacétique au moyen de la réaction de Legal modifiée par Imbert. 5 cm³ du liquide sont sursaturés avec de l'acide acétique cristallisable, plus une goutte en excès ; on leur ajoute 3 gouttes de solution fraîchement préparée de nitro-prussiate de soude à 5 % et on agite. Déposer doucement à la surface du liquide 1 cm³ NH³ en solution. Il se développe au bout d'un certain temps un anneau violet caractéristique. Dans ces conditions, nous avons obtenu avec le liquide contenant les excréta des Sangsues en anaérobiose un anneau violet persistant pendant plusieurs heures, établissant la présence d'acide butyrique.

Les Sangsues en anaérobiose excrètent donc de l'acide butyrique. Mais excrètent-elles uniquement cet acide ou bien un mélange de plusieurs acides volatils en C⁴, C⁵ et C³ comme nous l'avons supposé et comme cela semble démontré pour l'excrétion d'*Ascaris Lumbricoïdes* et *A. Megalocephala* ? En

vue de déterminer si l'on avait ici affaire à un mélange d'acides, nous avons utilisé la méthode classique de Duclaux dont on trouvera l'exposé dans le *Guide pour les manipulations de Chimie Biologique* de G. Bertrand et Thomas, pages 322 et suivantes.

Voici ce que disent ces auteurs à son sujet :

« La méthode de M. Duclaux est particulièrement applicable au dosage des acides volatils dans les liquides de fermentation. On doit commencer par se débarrasser des produits volatils non acides, tels que les alcools, en distillant le liquide au tiers environ, après l'avoir saturé pour retenir les acides volatils.

« On met ensuite ces acides en liberté en ajoutant un acide fixe en léger excès. On se sert pour cela d'acide tartrique qui a l'avantage, dans le cas fréquent où le liquide de fermentation contient des sels de Ca, de donner, si on attend quelques heures, un précipité cristallin de tartrate facile à séparer par décantation. En débarrassant ainsi le liquide à distiller de tout ou partie de sa chaux, on diminue sa richesse en éléments fixes et on le rend plus favorable au dosage des acides volatils, dosage d'autant plus précis que le liquide à étudier se rapproche plus d'une dissolution d'acides volatils dans l'eau pure...

« Le principe de la méthode est bien connu, il nous suffira de la rappeler : supposons une solution à 1 ou 2 % au maximum d'un acide volatil quelconque, amenons-la à un volume constant, par exemple 110 cm³, et distillons-la dans un ballon de 250 à 300 cm³ en relation avec un réfrigérant ordinaire. Recueillons dans cette distillation dix prises successives, chacune de 10 cm³ exactement mesurés. Chacune de ces prises est saturée à part à l'aide d'une solution alcaline quelconque et l'on inscrit à la suite les unes des autres les lectures faites successivement sur la burette, à la suite de ces opérations partielles. Supposons que la quantité d'acide total introduite dans le ballon exige 100 cm³ de la solution alcaline employée. Les lectures successives représenteront alors, en centièmes, les proportions de cet acide existant dans les 10, 20, 30, 40, etc., premiers cm³ passés à la distillation. Cela posé, on peut considérer comme démontrées les trois lois suivantes :

« 1° La marche des nombres pour cette série d'opérations est caractéristique de l'acide employé.

« 2° Il existe un rapport constant entre la quantité d'acide introduit dans le ballon et la quantité qui a distillé à un moment quelconque, de sorte que de la quantité passée dans les 10, 20, 30, 40, premiers cm^3 on peut conclure à la quantité d'acide total introduit dans le ballon à distillation.

« 3° S'il y a deux acides mélangés, chacun se comporte comme s'il était seul et suit les lois de sa distillation propre...

« Cas d'un mélange de deux acides : Si on a un mélange en quantités égales d'acide acétique et d'acide butyrique, la marche des nombres correspondant à la distillation de ce mélange sera la moyenne des nombres correspondant à chacun des deux acides et la courbe de distillation se tiendrait à égale distance dans le sens vertical de la courbe de l'acide acétique et de l'acide butyrique. S'il y a deux molécules d'acide butyrique contre une d'acide acétique, il faudra, pour avoir les nombres de la distillation, ajouter deux fois le nombre correspondant à l'acide butyrique au nombre correspondant à l'acide acétique et prendre le tiers de la somme obtenue.

« En somme, en ordonnant ou en traduisant sous forme de courbe les nombres fournis par l'expérience, on peut voir s'ils coïncident avec l'une des courbes données par les acides purs ou voir entre quelles courbes de la figure la courbe trouvée vient se placer.

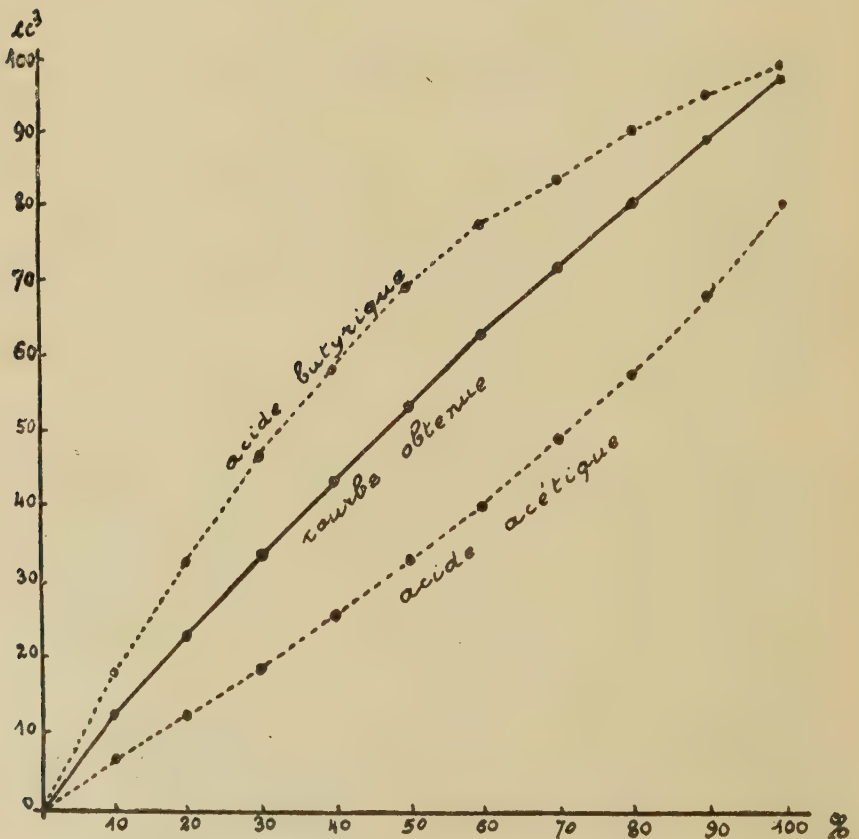
« On détermine la nature et la proportion des acides mélangés au moyen des tables de Duclaux.

Pour rechercher l'acide butyrique ou un mélange d'acides au moyen de la méthode de Duclaux, nous avons remis en anaérobiose, pendant quarante-huit heures, les lots 1 et 2 de Sangsues nous ayant servi pour les expériences précédentes. Il a été recueilli pour le lot I. (14 Sangsues), 500 cm^3 de liquide et pour le lot II, 750 cm^3 . Après réunion de ces deux liquides, nous avons pratiqué les essais suivants : 800 cm^3 de liquide filtré de pH 5,2 sont évaporés à sec en présence de NH^3 destinée à fixer les produits volatils. Le résidu, repris par de l'eau distillée, est acidifié avec de l'acide tartrique et distillé sous pression réduite à 50° . Il donne une acidité volatile de :

36 cm³ de Ba (OH)² $\frac{N}{100}$ soit 16,8 cm³ de Ba (OH)² $\frac{N}{46,6}$

Porté à 110 cm³ avec de l'eau, le distillat est soumis à une distillation fractionnée en dix portions titrées chacune avec le baryte N/46,6. Ces portions de 10 cm³ exigent pour la saturation :

1 ^o	2 cm ³	15,	soit 12,7 o/o de la totalité,	soit 13,2 o/o de ce qui passe dans 100 cm ³
2 ^o	3 »	90 »	23,2	» 24,0
3 ^o	5 »	65 »	33,6	» 34,8
4 ^o	7 »	30 »	43,4	» 45,06
5 ^o	8 »	95 »	53,3	» 55,2
6 ^o	10 »	5 »	62,5	» 64,8
7 ^o	12 »	»	71,4	» 74,
8 ^o	13 »	45 »	80,	» 83,
9 ^o	14 »	85 »	88,3	» 91,6
10 ^o	16 »	20 »	96,4	» 100



Si nous traduisons ces nombres sous formes de courbe, nous voyons que la courbe obtenue se place à égale distance dans le sens vertical de la courbe de l'acide acétique et de l'acide butyrique et correspond à la distillation d'un mélange à parties égales d'acide butyrique et d'acide acétique ou à l'acide propionique seul.

Nous nous heurtons donc à une impossibilité : l'acidité excrétée par la Sangsue en anaérobiose est presque uniquement une acidité volatile. Le carbone dû à cette acidité correspond exactement à un carbone C^4 (l'acide butyrique) ou à un mélange d'acides C^3 , C^4 , C^5 , dont la résultante égale C^4 . Or, l'acidité volatile trouvée par la méthode de Duclaux correspond à un mélange d'acide acétique (C^2) et d'acide butyrique (C^4).

Dans ces conditions, il n'est pas possible de tirer des conclusions de cet essai et de nouvelles recherches sont nécessaires qu'il ne nous a pas été possible de faire. Ajoutons, cependant, à titre d'hypothèse de travail, que l'acidité volatile qui n'est pas due à l'acide butyrique provient peut-être d'un mélange d'acides en C^1 , C^2 , C^3 , C^5 (avec prédominance de ce dernier) de telle sorte que le carbone dû à ces acides semble provenir seulement d'un acide en C^4 .

IV. — Le Carbone et l'Azote, le Rapport C/N

Le rapport entre les déchets azotés et carbonés éliminés par un animal est sensiblement constant, de telle sorte que le rapport du carbone total à l'azote total excrété a une valeur remarquablement fixe et en quelque sorte caractéristique de l'état physiologique.

C'est ainsi que, pour l'homme, le rapport C/N oscille à l'état physiologique entre 0,70 et 0,90, les valeurs supérieures caractérisant un état pathologique. Il en est probablement ainsi pour chaque espèce animale. Le rapport C/N est capable de renseigner sur la capacité de l'organisme à oxyder ou à utiliser les matériaux.

Nous avons réuni dans les tableaux qui suivent les rapports

C/N obtenus chez les Sangsues à jeun, alimentées ou en anérobiose.

Sangsues à jeun

	Périodes de 48 heures	Lots			
		N° I	N° II	N° III	N° IV
N. total mgr. pour 100 gr.	1	22,50	28,34	30,70	28,42
	2	16,87	19,42	19,69	19,67
	3	13,92	16,36	12,15	14,76
C. total mgr. pour 100 gr.	1	17,58	28,04	28,14	22,16
	2	14,17	15,93	19,04	18,09
	3	13,92	14,72	10,7	12,54
Rapport $\frac{C}{N}$	1	0,75	0,85	0,91	0,78
	2	0,84	0,82	0,96	0,92
	3	0,95	0,90	0,88	0,85

Sangsues alimentées

	Périodes de 48 h. après l'alimentation	Lots			
		N° I	N° II	N° III	N° IV
N. total mgr. pour 100 gr.	1	49,6	46,3	52,5	39,6
	2	12,0	36,03	22,5	16,9
	5	45,6	36,03	—	—
	6	30,04	—	—	—
	7	32,0	32,17	44,4	38,6
C. total mgr. pour 100 gr.	1	45,4	56,03	68,2	46,7
	2	26,8	68,9	45,0	35,3
	5	96,8	80,6	—	—
	6	46,9	—	—	—
	7	56,0	58,1	45,5	29,3
Rapport $\frac{C}{N}$	1	0,91	1,2	1,3	1,2
	2	2,2	2,5	2,0	2,08
	5	2,1	2,2	—	—
	6	1,5	—	—	—
	7	1,75	1,8	1,02	0,76

Sangsues en anaérobiose

Lots n ^{os}	I	II	I		
Durée et dates des analyses	48 h. 9 juin	24 h. 21 juin	24 h. 21 juin	24 h. 23 juin	48 h. (') 25 juin
—	—	—	—	—	—
N. T. en mgr. pour 100 gr.	31,58	9,64	7,10	7,10	33,94
C. T. en mgr. pour 100 gr.	81,79	35,91	51,56	73,66	39,80
Rapport $\frac{C}{N}$	2,59	3,72	7,94	10,3	1,08

L'étude du rapport C/N dans chacun de ces tableaux met en évidence les faits suivants :

Pour des Sangsues à jeun depuis plusieurs mois, le rapport C/N oscille autour de 0,86 en moyenne.

Les Sangsues alimentées ont une dyscarbonurie passagère que montre l'élévation du rapport C/N à 1,63 en moyenne (ce rapport ne dépasse pas 2,5) pendant les premiers jours qui suivent l'alimentation. Ce rapport s'abaisse dès le vingtième jour qui suit l'alimentation et atteint peu à peu les valeurs du jeûne.

Chez les Sangsues en anaérobiose, le rapport C/N s'élève beaucoup jusqu'à 10,3, ce qui montre l'existence d'une dyscarbonurie très marquée. La privation d'oxygène a eu pour effet, d'une part, de diminuer les échanges azotés, d'autre part, d'empêcher la combustion des acides organiques en CO² et H²O et, par suite, de provoquer une forte excretion de ces acides. Ces deux facteurs liés expliquent l'élévation du rapport C/N.

Cette brève étude du rapport C/N chez un Invertébré montre de quelle utilité peut être sa connaissance pour déterminer la capacité d'oxydation ou d'utilisation des matériaux ingérés par un animal.

1. — Retour à la vie aérobie.

V. — Rapport de carbone exhalé au carbone organique soluble

Un Homme de poids moyen (60 kilos) exhale en vingt-quatre heures 1.000 gr. environ de gaz carbonique, formés de 280 gr. de carbone. A ce carbone, éliminé sous forme minérale, vient s'ajouter le carbone excrété sous forme organique dans l'urine et les matières fécales. Le carbone urinaire est d'environ 10 gr. par vingt-quatre heures et le rapport du carbone urinaire organique (C.O.) au carbone de CO^2 exhalé (C.M. ou carbone minéral) est de 1 à 28, soit 3,5 %. L'élimination totale de carbone (C. T.) est donc, pour vingt-quatre heures, de $280 + 10 = 290$ gr. D'après ces chiffres, le rapport du carbone organique au carbone total est de 3,3 % environ.

Il nous a paru intéressant de rechercher, de la même façon, la part qu'occupe l'excrétion carbonée organique soluble dans l'excrétion carbonée totale de la Sangsue et le rapport du carbone organique au carbone minéral excrété sous forme de CO^2 .

Pour cela, 26 Sangsues, alimentées les unes le 13 avril et les autres le 4 mai, pesant 94 gr. 28, ont été mises dans un bocal clos contenant 500 cm^3 d'eau distillée. Pour assurer l'aération des animaux et entraîner le CO^2 formé, nous avons fait circuler dans le bocal, au moyen d'une trompe à eau dont le débit était convenablement réglé, un lent courant d'air privé de gaz carbonique par barbotage préalable à travers trois flacons laveurs en série, le premier contenant de l'acide sulfurique dilué (pour retenir NH^3) et les deux autres contenant de l'eau de baryte saturée (CO^2). Au sortir du bocal contenant les animaux, l'air passait dans deux petits flacons laveurs contenant chacun 10 cm^3 de $\text{Ba}(\text{OH})^2$ saturée ; on a recueilli ainsi sous forme de carbonate de baryum tout le CO^2 . Les trois expériences faites ont duré respectivement dix-sept heures, dix heures et dix-huit heures.

Nous avons dosé, en outre du CO^2 exhalé, le carbone organique soluble total, comme précédemment, et le carbone dissous dans l'eau à l'état d'acide carbonique. Pour ce dernier

dosage, on ajoute à 20 cm³ de liquide filtré un excès de baryte saturée, l'acide carbonique se précipite à l'état de carbonate de baryum que l'on recueille par centrifugation. Ce précipité est lavé à l'eau distillée, puis dissous à chaud dans 10 cm³ d'HCl N/20 coloré au rouge de méthyle (méthode de Pregl), l'excès d'acide chlorhydrique est alors dosé avec la solution de HONa N/20 jusqu'à coloration jaune. Le résultat est rapporté à 500 cm³ en sachant que 1 cm³ d'HO Na N/20 correspond à 3 mgr. de carbone.

Le carbone exhalé à l'état de CO² a été recueilli à l'état de CO³ Ba dans la baryte saturée, le précipité est isolé par centrifugation et lavé plusieurs fois à l'eau distillée pour enlever toute trace de baryte. Le carbonate de baryum est alors dosé comme précédemment, mais en utilisant des solutions acides et alcalines normales, ce qui est nécessaire, étant donnée la grosse quantité de CO³ Ba obtenu.

Nous avons calculé que les phosphates présents dans le liquide, et qui forment avec la baryte saturée du phosphate de baryum dosable en même temps que le carbonate de baryum, fausseraient les résultats de 1/10 de milligramme seulement en excès, ce que nous avons jugé négligeable.

Voici les résultats obtenus :

Durée des analyses en heures ..	17 h.	10 h.	18 h.
—	—	—	—
C. organique soluble (C.O.)	7,50	4,3	5,40
CO ² dissous (en C)	8,6	8,6	8,6
CO ² exhalé (en C) (C.M.)	23,4	13,8	22,2
Carbone total (C.T.)	39,5	26,7	36,2
Rapport $\frac{\text{C.O.}}{\text{C.T.}}$	18,9	16,0	15,0
Rapport $\frac{\text{C.O.}}{\text{C.M.}}$	31,8	31,0	36,2

Pütter a trouvé qu'un lot de Sangsues alimentées depuis trois mois, pesant 50 à 75 gr., avaient exhalé 86 à 136 mgr.

de CO^2 en quarante-huit heures pour une température de 17 à 19°. Ces chiffres sont comparables aux nôtres.

Il ressort du tableau précédent que le rapport du carbone organique au carbone total excrété est considérablement plus élevé chez la Sangsue que chez l'Homme, montrant ainsi que la combustion des matériaux carbonés se fait d'une façon imparfaite dans un organisme inférieur aquatique comme celui de la Sangsue et que, par suite, le rapport du carbone organique au carbone minéral est aussi beaucoup plus élevé (36 %).

Ajoutons que nous ne donnons ces résultats qu'à titre documentaire, trois expériences étant insuffisantes pour conclure définitivement.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nos recherches ont eu pour objet de donner, au moyen de microméthodes précises, une vue d'ensemble aussi complète que possible de l'excrétion de la Sangsue à l'état normal et dans diverses conditions : à jeun, après alimentation avec du sang et en anaérobiose. Dans les liquides contenant les excréta, nous avons dosé les principaux éléments minéraux, azotés et carbonés et établi les rapports de ces divers éléments entre eux en vue d'en dégager la signification biologique.

Les résultats les plus importants ont été résumés dans le tableau suivant qui représente l'excrétion de la Sangsue à jeun, deux excrétions extrêmes de la Sangsue alimentée (deux jours ou vingt jours après ingestion de sang) et l'excrétion type de la Sangsue placée en anaérobiose. Les résultats ont été rapportés à 100 grammes de matière vivante pour quarante-huit heures.

SANGSUES				
	à jeun	Alimentées 2 ^e jour	20 ^e jour	en anaérobiose dep. 48 hour.
pH ...	7,25	7,6	7,0	5,5
En mgr. pour 100 gr. :				
Chlorures (Cl Na)	9,01	488,2	9,4	17,82
Phosphates (P ² O ⁵)	0,74	Traces	0,28	0,412
Azote total	19,69	52,5	28,9	14,20
Azote ammoniacal	14,19	22,05	21,4	11,04
Azote aminé	1,27	3,75	1,6	1,14
Azote créatinine	2,14	2,75	2,35	1,22
Carbone total	19,04	63,2	34,2	147,32
Carbone ac. organiques	10,02	24,42	14,82	117,88
Ac. organiques totaux (A.O.T.)	15,99	21,78	23,21	119,98
Acides volatils (A.V.)	12,79	17,50	16,07	114,47
Pourcentage $\frac{A.V.}{A.O.T.}$	80,0	80,0	60,0	95,6
Carbone créatinine	2,60	3,14	2,73	1,46
Carbone ac. aminés	2,16	3,59	1,53	0,51
Carbone glucidique	1,25	3,81	2,0	3,44
Azote indosé	2,54	23,95	3,55	0,97
Carbone indosé	3,11	33,24	13,12	24,03
En pourcentages :				
$\frac{N (NH^3)}{N.T.}$	72,06	40,0	73,8	77,7
$\frac{N (NH^2)}{N.T.}$	6,44	4,14	5,5	8,1
$\frac{N. créatinine}{N.T.}$	10,86	5,23	8,2	8,6
$\frac{C.A.O.}{C.T.}$	52,2	35,8	45,3	80,2
$\frac{C. créatinine}{C.T.}$	11,9	4,6	7,9	1,0
$\frac{C. acides aminés}{C.T.}$...	11,05	5,2	4,4	1,3
$\frac{C. Glucidique}{C.T.}$	8,2	5,6	5,83	2,35
N. indosé	10,64	47,6	12,5	5,6
C. indosé	26,2	48,8	36,9	15,15
Rapport $\frac{C}{N}$	0,96	1,3	1,18	10,3

Voici les principaux faits mis en évidence :

CHAPITRE I. — *Le pH* de l'eau où ont vécu les animaux a été déterminé systématiquement au début de chaque analyse ; il est sous la dépendance de deux facteurs principaux agissant en sens inverse et tendant à s'équilibrer : d'une part, une excrétion ammoniacale abondante, d'autre part, une excrétion élevée d'acides organiques. Pendant le jeûne, le pH des liquides se maintient aux environs de 7,3, pH légèrement alcalin, mais très voisin de la neutralité. Aussitôt après la digestion, le pH semble s'élever (jusqu'à 7,6), ce qui peut s'expliquer par une combustion plus parfaite des acides organiques grâce à une respiration plus intense. En anaérobiose, la diminution des échanges azotés et la forte excrétion des acides organiques se traduisent par une baisse considérable du pH (jusqu'à 5,5).

Les chlorures, dosés par la méthode Charpentier-Vohlard, sont constamment présents dans les liquides d'excrétion. Pendant le jeûne, la quantité en est relativement constante, mais assez faible. Après ingestion de sang, 50 % environ des chlorures provenant du sang ingéré sont éliminés dans les dix jours qui suivent l'alimentation. Comme l'élimination des chlorures s'accompagne d'élimination d'eau, il s'ensuit une condensation de la masse alimentaire accumulée dans le tube digestif. L'anaérobiose n'a pas d'effet appréciable sur cette excrétion des chlorures.

Les phosphates, dosés par la méthode céruléo-molybdimétrique de G. Denigès, sont éliminés en quantité notable pendant le jeûne. Au contraire, ils sont indosables dans les premiers jours qui suivent l'alimentation et en quantité très faible, même au bout de vingt jours. Nous pensons que ce fait curieux dépend de plusieurs facteurs, en particulier d'une rétention des phosphates ingérés et d'une baisse de la dégradation des

phospho-nucléides et des lécithines, générateurs des phosphates. L'anaérobiose semble diminuer l'excrétion de P^2O^5 .

CHAPITRE II. — L'azote non protéique total, l'azote ammoniacal et aminé ont été dosés par la microméthode au formol de H. Delaunay ; la créatinine par la méthode colorimétrique de Folin.

L'azote non protéique total est éliminé en quantité plus abondante pendant l'alimentation que pendant le jeûne, cependant, dès le vingtième jour, l'excrétion tend à revenir aux valeurs enregistrées pendant le jeûne. Pendant l'anaérobiose, les échanges azotés sont diminués. La Sangsue, qui, comme l'a déjà signalé Pütter, a un métabolisme essentiellement protidique, dégrade mal les protides lorsqu'elle manque d'oxygène.

L'azote ammoniacal forme en moyenne pendant le jeûne les 72 centièmes de l'azote non protéique total. H. Delaunay a montré que l'excrétion d'ammoniaque est générale chez les invertébrés aquatiques, dont l'épuration est constante et facile.

Pendant l'alimentation, la Sangsue excrète moins d'azote ammoniacal et davantage d'azote sous une forme encore indéterminée ; cette forme d'excrétion n'est, du reste, que passagère. L'anaérobiose diminue considérablement l'excrétion ammoniacale en valeur absolue, mais le pourcentage par rapport à l'azote non protéique total a cependant tendance à s'élever (77,7 %).

L'azote des acides aminés constitue, pendant le jeûne, 6 % environ de l'excrétion azotée totale. Cette élimination d'acides aminés peut être considérée comme une perte pour l'organisme ; elle montre que la Sangsue a des processus de désamination moins actifs que ceux des vertébrés (rapport 1 à 2 %), il est probable que les acides aminés sont dégradés au cours de processus d'oxydation, car, d'une part, on constate la baisse de leur excrétion aussitôt après l'alimentation qui s'accompagne d'une forte élévation des combustions (Jolyet et Regnard) et, d'autre part, une élévation de leur excrétion dans l'anaérobiose.

L'azote de la créatinine constitue plus de 10 % de l'excrétion azotée totale pendant le jeûne et varie de 5,2 à 11,4 % chez les animaux en alimentation. Les variations de ces coefficients ne sont qu'apparentes et la Sangsue, à jeun comme alimentée, élimine en valeur absolue une quantité sensiblement constante de créatinine. L'anaérobiose semble cependant diminuer l'excrétion de la créatinine en valeur absolue.

CHAPITRE III. — Le carbone organique total soluble a été dosé par la microméthode de Nicloux et ses composants par les méthodes décrites dans la thèse de M. Lafargue, à l'exception du carbone réducteur de nature glucidique qui a été dosé par la méthode Hagedorn-Jensen. Le carbone appartenant soit à la créatinine, soit aux acides aminés a été calculé.

L'excrétion du *carbone organique soluble total* est assez abondante pendant le jeûne (19 mgr. 04 en moyenne pour 100 gr. pendant quarante-huit heures), elle augmente beaucoup dans les premiers jours qui suivent l'alimentation (68 mgr.) et baisse ensuite (34 mgr.). Pendant l'anaérobiose, elle devient énorme (147 mgr.). L'augmentation est due, après alimentation, à l'excrétion abondante d'un carbone neutre indosé et, pendant l'anaérobiose, à l'excrétion considérable des acides organiques. Par suite, le rapport C/N, égal en moyenne à l'unité lorsque les Sangsues sont à jeun, est plus élevé (au-dessus de 2) chez les Sangsues alimentées pendant les premiers jours de la digestion et baisse graduellement pour tendre vers les valeurs déterminées pendant le jeûne. En anaérobiose, ce rapport s'élève beaucoup (jusqu'à 10,3) à cause de la forte diminution des échanges azotés et de l'augmentation énorme de l'excrétion d'acides organiques.

Le carbone des acides organiques (C.A.O.) constitue une part importante du carbone soluble total (C.T.). Le rapport de C.A.O. à 100 C.T. atteint 22 à 45 pour les Sangsues alimentées, il s'élève à 50-63 % chez les Sangsues à jeun. Pendant l'anaérobiose, il forme plus de 80 % du carbone total ; les acides

organiques sont composés en majeure partie d'*acides volatils*, 82 % en moyenne dans le jeûne, 60 à 80 % pendant la digestion et jusqu'à 98 % en anaérobiose.

D'après nos recherches préliminaires, l'*acide butyrique* serait un des principaux constituants de l'acidité volatile.

Le carbone de la *créatinine* excrétée à jeun, après alimentation, et en anaérobiose est relativement fixe en valeur absolue (15 à 30 mgr.), mais l'excrétion carbonée totale s'élevant beaucoup pendant la digestion et l'anaérobiose, le pourcentage du C. créatinine au C. total est alors plus faible (1,0 à 7 %) qu'à jeun (11,9 %).

Le carbone des *acides aminés* (calculé comme carbone du glyocolle) forme 1,3 à 11 % de l'excrétion carbonée totale. Comme nous l'avons déjà dit à propos de l'azote, cette élimination est relativement faible et laisse supposer des processus d'oxydation assez actifs.

Des corps réducteurs de nature glucidique sont éliminés normalement par la Sangsue. Le carbone de ces corps varie entre 2,3 à 8 % du carbone total pendant le jeûne. Il est moins élevé et plus fixe (5 à 6 %) pendant la digestion. En anaérobiose, il est diminué en valeur relative, par suite de l'excrétion énorme d'acides organiques, mais reste à peu près fixe en valeur absolue. En additionnant les valeurs obtenues pour les diverses formes du C. organique que nous avons dosées, on constate qu'une partie du C. total reste *indéterminée*, même lorsqu'on tient compte du carbone apporté par l'urée et par les bases puriques que nous n'avons pas déterminé personnellement, mais dont les valeurs sont connues. Le carbone indéterminé forme pendant le jeûne les 10 centièmes du carbone total, pendant l'alimentation les 33 à 41 centièmes et pendant l'anaérobiose 16 centièmes.

Enfin, nous avons calculé le rapport du carbone organique soluble (C.O.) au carbone total (C.T.) composé de la somme

carbone organique soluble + carbone de l'acide carbonique exhalé. Ce rapport est de 16 à 18 % pour les Sangsues examinées.

Les Sangsues supportent bien l'anaérobiose et les troubles si intenses de l'excrétion carbonée et de l'excrétion azotée disparaissent rapidement lorsque les animaux sont remis en vie normale.

Vu : *Le Doyen*,
C. SIGALAS.

VU, BON A IMPRIMER :
Le Président,
H. DELAUNAY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Bordeaux, le 20 Juillet 1933
Le Recteur de l'Académie,
TERRACHER.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABELOOS M. — *Sur les processus histophysiologiques de l'excrétion chez les Hirudinées Rynchobdelles et sur la signification physiologique de certaines cellules de leur tissu conjonctif.* C. R., Soc. Biol., T. 90, 1924.
2. BERTRAND et THOMAS. — *Guide pour les manipulations de chimie biologique*, p. 322 et suivantes.
3. BEHRE et BENEDICT. J. biol. Chem., T. 52, p. 14.
4. BIALAZEWICKZ K. — *Etudes comparées sur le métabolisme chimique et énergétique.* Trav. Soc. de Varsovie, n° 32, 1919. — *Influence de la nutrition sur le métabolisme chimique et énergétique chez les sangsues.* Archiv. intern. Physiol., T. 23, 1924.
5. BURIAN R. — *Die Excretion : Würmer.* Handbuch der vergleichenden Physiologie von Hans Winterstein. T. 2. Stoffwechsel, 2^e partie, 1924. G. Fischer, Iéna.
6. DELAUNAY H. — *Recherches biochimiques sur l'excrétion azotée des Invertébrés.* Thèse doctorat ès-Sciences naturelles. Paris 1927-28.
7. DELAUNAY H. — *Recherches sur les échanges azotés des Invertébrés.* Archiv. int. Phys., T. 13, 1913.
8. DELAUNAY H. — *Sur l'excrétion azotée des Vers. La surcharge en urée des hématies du Siponcle.* C. R., Soc. Biol., T. 95, 1926.
9. DENIGÈS, CHELLE, LABAT. — *Précis de Chimie analytique*, 6^e édition.
10. DUCLAUX. — (Voir Bertrand et Thomas.)

11. FISCHER-ANTON. — *Über den Kolhehydratsstoffwechsel von Ascaris megalcephala*. Biochem. Zeitsch., T. 144, 1923, p. 224.
12. FLURY F. — *Zur Chemie und Toxicologie der Ascariden*. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharma. T. 67, 1912, p. 275.
13. FOLIN. — *Dosage de la créatine et de la créatinine dans le sang et les tissus*. Journ. of biol. Chemistry, T. 17, p. 475, 1914.
14. DERRIEN et FONTÈS. — *Chimie biologique médicale*. J.-B. Bailière, 3^e édition, 1931.
15. FOSSE R. — *Présence de l'urée chez les Invertébrés et dans leurs produits d'excrétion*. C. R. Ac. Sc., T. 157, 1913.
16. FOSSE. — *Recherches sur le mécanisme de la formation de l'urée*. Bull. de la Soc. de Chim. Biol., T. 2, 1920.
17. GENAUD P. — *Statique et dynamique de l'eau dans l'organisme à l'état physiologique et à l'état pathologique*. Thèse médecine, Bordeaux, 1928.
18. GRAP A. — *Hirudine en studien*. Acta. Acad. Léopold. Carol. d. Naturforscher. T. 32, 1899.
19. GRIFFITHS A.-B. — *On the nephridia of Hirudo medicinalis*. Proc. of the Roy. Soc. of Edinburgh, T. 14, 1887.
20. HAGEDORN-JENSEN. — *Méthode de dosage du sucre du sang*. Biochem. Ztschr., 85, 46, 1923.
21. JOLYET et REGNARD. — *Recherches sur la respiration des animaux aquatiques*. Arch. de Physiol., T. 4, 1877.
22. KOWALEVSKY A. — *Etudes biologiques de quelques Hirudinées*. C. R. Ac. Sc., T. 122, 1896.
23. LAFARGUE. — *Recherches biochimiques sur les acides organiques de l'urine humaine*. Thèse de l'Université (Pharmacie). Bordeaux, 1931-32.
24. LAUDAT. — Bull. Soc. Chim. Biol., T. 9, 1927, p. 145.
25. LESSER E.-J. — *Chemische Prozesse bei Regenwürmern I. Der Hungerstoffwechsel*. Zeitsch. f. Biol. T. 50, 1908.
26. MAUBAN H. — *Contribution à l'étude de l'acétonurie au point de vue chimique*. Thèse médecine, Paris, 1905.

27. MARCHAL P. — *Contribution à l'étude de la désassimilation de l'azote. L'acide urique et la fonction rénale chez les Invertébrés.* Mém. Soc. Zool. France, T. 3, 1889 et Thèse médecine, Paris, 1888-89.
28. MESTREZAT W. — *Techniques courantes de chimie clinique*, 1930.
29. NICLOUX. — *Microdosage du carbone. Application à la détermination du carbone urinaire.* Bull. Soc. Chim. Biol., 1927, T. 9.
30. PIPAT (M^{lle}). — *Contribution à l'étude de l'ammoniurie et de l'acidoacidurie chez le Lapin.* Thèse pharmacie, Bordeaux, 1929-1930.
31. PÜTTER A. — *Der Stoffwechsel des Blutegels (Hirudo medicinalis)* Zeitsch. f. allg. Physiol. T. 6., 1907 et T. 7, 1907.
32. PRZYLECKY St.-J. — *Présence et répartition de l'urée chez les Invertébrés.* Arch. int. Physiol., T. 20, 1922-23.
33. PRZYLECKY St.-J. — *L'excrétion ammoniacale chez les invertébrés dans des conditions normales et expérimentales.* Ibid., T. 20, 1922.
34. PRZYLECKY St.-J. — *La répartition et la dégradation de l'acide urique chez les Invertébrés.* Ibid., T. 27, 1926.
35. SPALLANZANI. — *Mémoires sur la respiration.* Genève, 1903.
36. SPIESS. — *Recherches sur l'évolution de la fonction digestive avec quelques réflexions sur les progrès de la Physiologie.* Edition Vigot frères, Paris, 1909.
37. TERROINE F., B. BONNET, P. DANMANVILLE et M^{lle} G. MOUROT. — *Contribution à la connaissance de la physiologie de la créatinine et de la créatine.* Bull. Soc. Chim. biol., 1932, T. 14, 12-46.
38. TERROINE E.-F. et GARROT L. — *L'excrétion de la créatinine et la grandeur de la dépense énergétique des Homéothermes.* Arch. int. physiol., 1926, T. 27, p. 69.
39. TERROINE F., M^{lle} CHAMPAGNE et MOUROT. — *La répartition des représentants urinaires du métabolisme azoté et sa signification physiologique.* Bull. Soc. Chim. biol., 1933, T. 15, p. 203.

40. VIEWEGER T. — *Sur la production de réserves de glycogène et de graisses pendant l'assimilation des protéines chez les animaux poïkilothermes.* Arch. intern. Physiol., T. 25, 1925.
41. WEINLAND E. — *Über die Zersetzung der stickstoffhaltiger Substanz bei Ascaris.* Zeitsch. f. Biol., T. 45 (1904), p. 517.
Über die von Ascaris angeschied. Fettsäure. Ibid. T. 45, p. 113.
42. WIGGLESWORTH B. — *The physiology of excretion in a blood-sucking Insect. Rhodnius prolixus,* Journ. of. experim. Biol., T. 8, 1931, p. 411.
43. WILLEM et MINNE. — *Recherches sur l'excrétion de quelques annélides.* Mém. cour. Acad. Roy. Belgique. Série 1, 1899.
44. YOVANOVITCH A. — *Microdosage de l'ammoniaque. Application au dosage de l'ammoniaque urinaire.* Bull. Soc. Chim. biol., 1925, T. 7, p. 665.

